

In situ PCR amplification system.**Patent number:** DE69323720T**Publication date:** 1999-07-01**Inventor:** ATWOOD JOHN G (US); HAFF LARRY (US)**Applicant:** PERKIN ELMER CORP (US)**Classification:****- international:** B01J19/00; B01L3/00; B01L7/00; C12Q1/68;
G01N1/31; B01J19/00; B01L3/00; B01L7/00;
C12Q1/68; G01N1/30; (IPC1-7): B01L7/00; B01J15/00;
B01L3/00**- european:** G01N1/31B; B01J19/00C; B01L3/00C2; B01L7/00D;
C12Q1/68B14**Application number:** DE19936023720T 19930930**Priority number(s):** US19930017721 19930216**Also published as:**

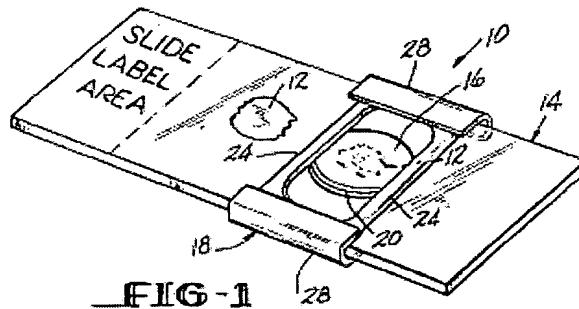
- EP0611598 (A2)
- US5364790 (A1)
- JP6245771 (A)
- EP0611598 (A3)
- EP0611598 (B1)

[more >>](#)[Report a data error](#)

Abstract not available for DE69323720T

Abstract of corresponding document: **EP0611598**

A complete in situ PCR system for amplification of nucleic acids contained in a prepared cell or tissue sample. The containment system for the PCR sample comprises a glass microscope slide, a specimen sample containing the target nucleic acid sequence mounted on the slide, a flexible plastic cover over the sample, and a retaining assembly fastened to the slide and to the cover to retain and seal a reaction mixture against the sample during thermal cycling. The retaining assembly includes a rigid ring on a rim portion of the cover, a cross beam having spaced parallel rails joined by opposite flat ends, and a pair of clips which are pressed over the ends and opposite sides of the slide to fasten the cross beam and cover to the slide.

**FIG. 1**Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide**BEST AVAILABLE COPY**



⑯ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑯ Übersetzung der
europäischen Patentschrift
⑯ EP 0 611 598 B 1
⑯ DE 693 23 720 T 2

⑯ Int. Cl. 6:
B 01 L 7/00
B 01 L 3/00
B 01 J 15/00

⑯ Deutsches Aktenzeichen: 693 23 720.1
⑯ Europäisches Aktenzeichen: 93 115 813.3
⑯ Europäischer Anmeldetag: 30. 9. 93.
⑯ Erstveröffentlichung durch das EPA: 24. 8. 94
⑯ Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: 3. 3. 99.
⑯ Veröffentlichungstag im Patentblatt: 1. 7. 99

⑯ Unionspriorität:
17721 16. 02. 93 US

⑯ Patentinhaber:
The Perkin-Elmer Corp., Norwalk, Conn., US

⑯ Vertreter:
Grünecker, Kinkeldey, Stockmair & Schwanhäusser,
Anwaltssozietät, 80538 München

⑯ Benannte Vertragstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, NL,
SE

⑯ Erfinder:
Atwood, John G., West Redding, CT 06896, US;
Haff, Larry, Wilton, CT 06897, US

⑯ In situ PCR Vermehrungsverfahren System

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

DE 693 23 720 T 2

08.02.99

EPA 93 115 813.3

Hintergrund der Erfindung

Erfindungsfeld

Die vorliegende Erfindung betrifft allgemein ein System zum Durchführen der Polymerase-Kettenreaktion (PCR = Polymerase Chain Reaction) und insbesondere eine Vorrichtung und ein Verfahren zum Durchführen einer PCR auf einer DNS- oder RNS-Probe, ohne diese aus ihrer ursprünglichen Zellenstruktur zu entfernen.

Beschreibung des Standes der Technik

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein Prozeß zum Herstellen einer sehr großen Anzahl von genauen Kopien eines Abschnitts einer doppelstrangigen DNS (Amplifikation) durch thermisches Wechselbehandeln von einem oder mehreren Molekülen der DNS (der Matrizen-DNS) in Anwesenheit eines thermisch stabilen DNS-Polymerase-Enzyms (typischerweise Taq-Polymerase), der vier DNS-Nukleotidenbasen und zwei oder mehreren einstrangigen DNS-Primern. Diese Primer sind kurze Abschnitte in der Größenordnung von 20 Basen, die den 5'-Enden der zwei komplementären DNS-Einsträngen der doppelstrangigen Matrize komplementär sind.

PCR ist eine immens wertvolle Technik, die weit verbreitet ist und das Gebiet der Molekulärbiologie revolutioniert hat. Die Technik ist ausführlich in den US-Patenten 4,683,195, 4,683,202 und 4,965,188 beschrieben. Die Reaktion wurde bis vor kurzem in Lösung in kleinen Reaktionsgefäßen ausgeführt, in der die zu amplifizierende DNS in Suspension ist. Eine Vorrichtung für diesen Prozeß wird in dem US-Patent 5,038,852 und in EP-A-0567284 angegeben.

In letzter Zeit wurde herausgefunden, daß es möglich ist, PCR für die Amplifikation besonderer DNS-Abschnitte innerhalb von Zellen anzuwenden, ohne daß die DNS aus den Zellen extrahiert werden muß. Diese Technik wird als in-situ-PCR bezeichnet. Die Zellen können einzelne Zellen oder ein Teil einer Gewebeprobe sein. Meistens wird die in-situ-PCR bei Zellen oder dünnen Gewebeschnitten durchgeführt, die auf Mikroskop-Objektträgern positioniert sind. Die Zellen oder das Gewebe werden gewöhnlich durch eine Behandlung mit Formalin oder einem anderen Reagens fixiert, so daß ihre Morphologie erhalten und nach der Behandlung erkennbar ist.

Wenn der ausgewählte DNS-Abschnitt derart amplifiziert wird, daß die amplifizierte Produkt-DNS selektiv gefärbt werden kann, dann kann eine mikroskopische Untersuchung der PCR-behandelten Zellen identifizieren, welche Zellen in einer Gewebeprobe, wenn vorhanden, den besonderen DNS-Abschnitt enthalten und sogar wo in der Zelle er lokalisiert ist. Eine Sichtbarmachung der amplifizierten DNS innerhalb der Zellen kann durch eines von zwei Verfahren erreicht werden. Ein Verfahren verwendet eine komplementäre einstrangige DNS-Probe, an die ein Indikatormolekül angefügt wurde. Diese Probe wird mit den besonderen DNS-Sequenzen in der amplifizierten Probe hybridisiert, wenn vorhanden, und die überschüssige Probe und der Indikator werden weggewaschen. Dann werden die Positionen der verbleibenden Indikatormoleküle durch die Behandlung mit Entwicklungsreagenzien sichtbar gemacht. Diese Technik zum Sichtbarmachen wird als „in-situ-Hybridisierung“ oder „indirekte Feststellung“ der in situ amplifizierten DNS bezeichnet.

Das andere Verfahren zum Sichtbarmachen besteht darin, während des PCR-Prozesses ein PCR-Reagens zu verwenden, das modifizierte DNS-Nukleotidbasen enthält, an die ein Indikatormolekül angefügt wurde. Viele modifizierte Basen mit Indikatormolekülen werden durch die DNS-Polymerase direkt in das amplifizierte Produkt eingebaut. Die Position der amplifizierten DNS kann dann wie zuvor durch das Behandeln des Objektträgers mit Entwicklungsreagenzien sichtbar gemacht werden. Dieses Verfahren wird als „direkte Integrationsfeststellung“ der in situ amplifizierten DNS bezeichnet.

Die Entwicklungsreagenzien in beiden Verfahren umfassen typischerweise Enzyme wie Alkaliphosphatase in Verbindung mit einem Molekül, das sich stark und spezifisch mit dem Indikatormolekül auf der amplifizierten DNS oder auf der hybridisierten Probe verbindet, sowie ein Substrat, das durch das Enzym typischerweise in einen nicht lösbar, stark absorbierenden Farbstoff umgewandelt wird. Wenn das Indikatormolekül auf der amplifizierten DNS Biotin ist, dann ist das mit dem Enzym verbundene Bindungsmolekül typischerweise Avidin. Wenn das Indikatormolekül Digoxigenin, dann ist das Verbindungsmolekül ein Antidigoxigenin-Antikörper. Beide Arten von Entwicklungsreagenzien wurden sowohl in der indirekten Feststellung durch die in-situ-Hybridisierung und in der direkten Integrationsfeststellung verwendet. Die Indikatoren der Indikatormoleküle können gefärbt, fluoreszierend oder radioaktiv sein.

Beide Verfahren der Feststellung der in situ amplifizierten DNS können sehr empfindlich sein und von zehn zu einigen hundert Kopien des amplifizierten DNS-Segments in jeder Zelle

feststellen. Beide Verfahren erfordern eine gewissen Nach-PCR-Verarbeitung des Objektträgers nachdem die in-situ-Thermowechselbehandlung abgeschlossen ist.

Verfahren zum Wechselbehandeln für die in-situ-PCR von ganzen Zellen unterscheiden sich je nach der Zellenquelle. Zellen, die kein Gewebe bilden, wie Leukozyten und viele Kultuszellen (wie He-La-Zellen) erfordern nicht notwendigerweise eine spezielle Instrumentation für das in-situ-PCR-Thermowechselbehandeln. Hasse et al. berichten in Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1987, 4971-4975 (1990), daß Suspensionen derart fixierter Zellen in denselben Reagenzgläsern thermisch wechselbehandelt werden können, die normalerweise für die Lösungsphasen-PCR verwendet werden, und daß die Zellen danach auf einem Objektträger für die Feststellung des amplifizierten Produkts verteilt werden.

Häufig werden derartige Zellen jedoch auf einem Objektträger thermisch wechselbehandelt. Sie werden durch Zentrifugieren auf dem Objektträger verteilt, wobei ein sogenanntes „Zytospin“-Präparat erzeugt wird. Das Verteilen derartiger Zellen erleichtert die Fixierverfahren und anderen Behandlungen der Probe vor der PCR. Dies erfordert keinen zusätzlichen Aufwand, da der Zytospin-Schritt sowieso später für die Sichtbarmachung des amplifizierten Produktes auf dem Objektträger erforderlich ist. Zytospins werden genauso wie auf Objektträgern aufgebrachte Gewebe amplifiziert.

Wenn Zellen in Gewebeschnitten untersucht werden sollen, müssen sie direkt auf einer Oberfläche amplifiziert werden, da die dünnen Schnitte ansonsten nicht die Morphologie des Gewebes wiedergeben können. Beim thermischen Wechselbehandeln der Gewebe ist es problematisch, die Gewebemorphologie und die Zellenmorphologie beizubehalten, die Verdampfung der PCR-Reaktionsmixtur über der Probe zu verhindern und einheitliche, wiederholbare Ergebnisse zu erhalten.

Um die in-situ-PCR auf fixierten Zellen oder Gewebeproben auf einem Mikroskop-Objektträger aus Glas durchzuführen, muß man erstens einen Objektträger verwenden, der derart behandelt wurde, daß die Zellen oder das Gewebe auf dem Objektträger haften und nicht durch die wäßrigen Behandlungen für die Sichtbarmachung der amplifizierten DNS weggeschwemmt werden. Typischerweise ist ein mit Silan behandelter Objektträger geeignet, der an seiner Oberfläche kovalente Bindungen mit 3-Aminopropyl-Triethoxsilan-Molekülen eingehaftet. Alternativ dazu können Beschichtungen aus Poly (Lysin) oder Gelatine/Chromalaun verwendet werden.

Als nächstes wird die Fläche des Objektträgers mit der zu amplifizierenden Probe großzügig mit dem PCR-Reagens bedeckt, das DNS-Polymerase-Enzyme, Nukleotiden, Primer und andere Komponenten in den richtigen Konzentrationen enthält. Dann müssen der Objektträger und das Reagens typischerweise 10 bis 30 Mal mit Temperaturen von typischerweise ungefähr 95°C und 68°C, manchmal jedoch nur 37°C wechselbehandelt werden, wobei während jedes Zyklus wenigstens eine Minute oder länger bei jeweils jeder der zwei oder drei ausgewählten Temperaturen verblieben wird.

Es gibt einige wichtige Anforderungen, die während der thermischen Wechselbehandlung erfüllt werden müssen, damit die in-situ-PCR erfolgreich ist. Eine Anforderung besteht darin, daß die Verdampfung von Wasser aus dem Reagens beinahe vollständig verhindert werden muß. Es kann keine Änderung von mehr als 5% der optimalen Reagenskonzentrationen toleriert werden, ohne daß niedrigere Amplifikationsergebnisse oder eine schlechtere spezifische Wirkung resultieren. Eine andere Anforderung besteht darin, daß kein der PCR-Reaktion entgegenwirkendes Material während des Prozesses in Kontakt mit dem Reagens kommen darf. Eine weitere Anforderung besteht darin, daß Luftblasen oder gelöstes Gas, die bei der Erwärmung durch das Reagens gelöst werden, nicht den Zugriff des flüssigen Reagens auf die gesamte zu verarbeitende Fläche stören dürfen.

Veröffentlichungen über die in-situ-PCR zeigen, daß es für die Beibehaltung einer sehr spezifischen Amplifikation häufig wichtig ist, die Reaktion so vorzusehen, daß ein „heißen Start“ oder sein chemisches Äquivalent erreicht wird. Bei einem physikalisch heißen Start wird das ganze Reagens weder zusammengestellt noch kontaktiert es die Probe-DNS, bis alle für die Reaktion erforderlichen Komponenten auf eine hohe Temperatur erwärmt sind. Die Temperatur muß hoch genug sein, so daß keine Teilhybridisierung der Primer an anderen Positionen als der vorgeschriebenen Matrizenposition auftreten kann, obwohl das gesamte Genom der Zelle für die nicht-spezifische Teilhybridisierung der Primer verfügbar ist. Die Temperatur muß auch hoch genug sein, um zu verhindern, daß sich Primermoleküle verbinden, um ein amplifizierbares Produkt zu bilden, das als „Primer-Dimer“ bezeichnet wird. Diese sichere Starttemperatur liegt typischerweise im Bereich von 68°C bis 75°C und ist typischerweise um 10°C wärmer als die in der PCR verwendete Abkühltemperatur.

Eine Möglichkeit zum Erreichen eines „chemisch heißen Starts“ in einer PCR besteht darin, in dem Reagens eine wärmeempfindliche Komponente wie ein einstrangiges Bindungsprotein (SSB = Single Strand Binding) vorzusehen, das eine Erweiterung durch das Polymeraseenzym verhindert, bis die Reaktionsmischung im ersten PCR-Zyklus auf eine Tempe-

ratur erwärmt wird, die hoch genug ist, um eine nicht-spezifische Hybridisierung zu verhindern und die wärmeempfindlichen SSB-Komponenten zu zerstören. Eine andere Möglichkeit zum Implementieren eines chemisch heißen Starts besteht darin, das dUTB durch Urazil zu ersetzen und zu dem Reagens das wärmeempfindliche Enzym UNG (Urazil-N-Glykosylase) hinzuzufügen, das alle PCR-Produkte zerstört, die bei der Inkubationszeit mit niedriger Temperatur vor dem ersten PCR-Zyklus erzeugt werden.

Eine weitere Möglichkeit zum Implementieren eines chemisch heißen Starts besteht darin, das Taq-Polymeraseenzym mit einem Taq-Antikörper zu kombinieren, bevor es zu dem Reagens hinzugefügt wird. Ein derartiger monoklonaler Antikörper wurde vor kurzem von Dr. John Findlay der Kodak Clinical Products Division in einer Veröffentlichung mit dem Titel „Development of PCR for In Vitro Diagnostics“ der 1992 San Diego Conference: Genetic Recognition, November 18-20, 1992 vorgestellt. Der Taq-Antikörper bindet sich mit dem Taq-Polymeraseenzym und verhindert dessen Funktion bei normalen Temperaturen. Beim Erwärmen der verhinderten Taq-Polymerase auf beinahe 95°C wird der Taq-Antikörper, der ein normales Protein ist, denaturiert, wodurch das Taq-Polymeraseenzym entbunden wird und normal im PCR-Prozeß funktionieren kann.

Diese Typen von chemisch heißen Starts erfordern das Aufnehmen einer häufig teuren Komponente (z.B. UNG oder eines Taq-Antikörpers) in das Reagens und können der Leistung der PCR unvorteilhafte Beschränkungen auferlegen, wie etwa ein relativ kurzes Zeitlimit zwischen der Vorbereitung eines Reagens und der Zeit, zu der es benutzt werden muß, oder eine geringere Effektivität der Amplifikation. Es ist deshalb vorzuziehen, physikalisch heiße Starts bei der in-situ-PCR durchzuführen, wenn dies möglich ist.

Laborarbeiter erfüllen die oben genannten Anforderungen bei der in-situ-PCR durch verschiedene Möglichkeiten, die sie häufig in ihren eigenen Labors entwickelt haben. Die unter Verwendung der in-situ-PCR erhaltene Information kann häufig nicht in anderer Weise erhalten werden und ist derart wertvoll, daß der ungewöhnlich hohe Aufwand und die ungewöhnlich hohe Investition von Wissen toleriert wird, um diese Information zu erhalten.

Eine verbreitete Strategie besteht darin, einen Deckel über eine zu amplifizierte Probe zu legen und diesen mit Nagellack oder einem ähnlichen Kleber zu dichten, wie durch Kommnoth et al. in Diagnostic Molecular Biology 1, #2, 85-97 (1992) gelehrt. Es ist nicht ungewöhnlich, daß derartige Anordnungen lecken, da der Nagellack nicht stark an den Gewebeproben haftet. Da alle das Reagens enthaltenden Komponenten starr sind, werden

hohe Drücke bei der Denaturisierungstemperatur (typischerweise 94°C) erzeugt, die den Nagellack wegdrücken können. Der harte Deckel kann auch die Morphologie der empfindlichen Zellen zerstören, wenn er diese berührt. Dieses Verfahren erlaubt keine praktischen heißen Starts. Ein anderer Nachteil besteht in der Anforderung einer Chloroformbehandlung der Anordnung, um den Nagellack nach der Wechselbehandlung zu entfernen.

Derartige Objektträger werden typischerweise auf den Probenblock von Thermozykluseinrichtungen gelegt, die nicht eigens für Objektträger ausgebildet sind. Um einen guten Wärmekontakt zu erhalten, verwenden Komminoth et al. einen Abstandhalter zwischen dem Probenraumdeckel der Thermozykluseinrichtung und dem Objektträger, um den Objektträger gegen den Probenblock zu drücken. Weiterhin sehen bestehende Thermozykluseinrichtungen mit Löchern im Thermoblock zum Aufnehmen von Reagenzgläsern keinen gleichmäßigen Wärmekontakt und damit keinen gleichmäßige Temperatur für Objektträger vor.

Eine verwandte Technik wird von Chiu et al. J. Histochemistry and Cytochemistry 40, #3, 333-341 (1992) demonstriert, der zu untersuchende Zellen auf Objektträgern mit Kammern züchtet und eine in-situ-PCR der Zellen auf denselben Objektträgern durchführt. Nach dem Züchten werden die Kammerwände entfernt, wobei aber die Dichtung zwischen dem Objektträger und den Kammern auf dem Objektträger gelassen wird. Um eine in-situ-PCR durchzuführen, werden die Zellen zuerst mit einer PCR-Reaktionsmischung bedeckt, die 2,5% Agarose enthält, und werden die Objektträger eng mit einem Saranband umwickelt. Dieses Verfahren sieht eine flexible Bedeckung der Zellen vor, die auf den Dichtungen aufliegt, so daß eine Beschädigung der Zellen vermieden wird. Das Saranband ermöglicht eine Kontrolle der Verdunstung. Die gesamte Anordnung wird auf eine Perkin-Elmer-Cetus-DNA-Thermozykluseinrichtung gelegt, wobei Wasser in die langen Schlitze zwischen den Proben gegeben wird. Die Anordnung wird vor der Wechselbehandlung mit einem Kunststofffilm und einem Kunststoffdeckel bedeckt.

Nuovo et al. in American Journal of Pathology, #6, 1239-1244 (1992) bedecken die Proben mit einem Deckel aus einem flexiblen, temperaturbeständigen Polypropylen. Der Deckel wird typischerweise über dem gewünschten Gewebe mit einem Tropfen Nagellack an einer Ecke fixiert. Der Objektträger wird typischerweise in einem Aluminium-„Boot“ plaziert, das auf dem Probenblock einer Perkin-Elmer-Cetus-DNA-Thermozykluseinrichtung positioniert wird. Dieses „Boot“ dient vor allem dazu, das Mineralöl zu halten, das später zu der Objektträger-Anordnung hinzugefügt wird, um eine Verdampfung der Reagenzien zu verhindern. Nach dem Bedecken der Probe mit der PCR-Reaktionsmischung ohne Taq-DNS-Polymerase, wird

die Temperatur der Probe typischerweise auf ungefähr 65°C erhöht und der Deckel teilweise gehoben, um die Taq-Polymerase in die Reaktionsmischung einzuführen und die PCR-Reaktion einzuleiten.

Die Möglichkeit zum Heben des Deckels erlaubt einen heißen Start, was eine beträchtliche Verbesserung der spezifischen Wirkung und des Ertrags des spezifischen PCR-Produkts in der in-situ-PCR-Amplifikation ermöglicht. Nach dem Einführen des Enzyms wird zuvor erwärmtes Mineralöl auf die Oberseite und die Seiten des Deckels gegeben. Etwas Öl wird aufgrund der Kapillarwirkung auch unter den Deckel gezogen. Das Öl reduziert den Durchmesser des Tröpfchens des PCR-Reagens unter dem Deckel sowie die Kontrolle über die exakte Positionierung des Tröpfchens des PCR-Reagens. Das Verfahren ermöglicht exzellente Ergebnisse, erfordert jedoch sehr geschickte Bediener, ist umständlich und ist nicht für eine große Anzahl von Objektträgern geeignet.

Ein anderes verwendetes Verfahren zum thermischen Wechselbehandeln und zum Reduzieren der mit der Verdampfung und der Kondensation verbundenen Probleme besteht darin, die Objektträger in Kunststoffbeuteln zu plazieren und diese in einer Luftofen-Thermozykluseinrichtung wechselzubehandeln. Zum Beispiel bedecken Staskus et al. in Microbial Pathogenesis 1991, 11, 67-76 (1991) und Emberto et al. in Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 357-361 (1993) Objektträger mit einem Deckel und dann mit Mineralöl, bevor sie die Objektträger in einen gegenüber Hitze dichten Kunststoffbeutel plazieren, der in einer Luftofen-Thermozykluseinrichtung wechselbehandelt wird. Mit dem Luftofen wird das Problem des Verdampfens des Wassers aus der Probe und des Kondensierens desselben auf dem Deckel vermieden, weil die gesamte Anordnung während der thermischen Wechselbehandlung im wesentlichen isothermisch ist.

Der Hauptnachteil bei der Verwendung eines Luftofens besteht darin, daß die schlechten Übertragungseigenschaften des Systems sehr langsame Zykluszeiten bedingen. Derartige Systeme weisen häufig auch eine schlechte Gleichmäßigkeit der Temperatur bei aufeinanderfolgenden Proben auf.

Alles in allem bietet keines der bestehenden Verfahren jeweils die vorteilhaften Aspekte einer guten thermischen Gleichmäßigkeit, einer Kontrolle der Verdampfung ohne Mineralöl, eines kleinen Reagensvolumens, der Erhaltung der Zellenmorphologie, der Fähigkeit eines heißen Starts und der praktischen Anordnung einer großen Anzahl von Objektträgern für eine thermische Wechselbehandlung in einer anderen Anordnung als der horizontalen. Bei-

nahe jeder verwendet heutzutage das Eintauchen des vorbereiteten Objektträgers in Mineralöl, um das Verdampfen von Wasser aus dem Reagens während der thermischen Wechselbehandlung zu vermeiden.

Die Ölbeschichtung ist extrem unpraktisch, weil sie gewöhnlich in zusätzlichen Schritten nach dem thermischen Wechselbehandeln und vor der weiteren Verarbeitung mit Feststellungsreagenzien sorgfältig und vollständig entfernt werden muß. Öl ist manchmal auch Träger von Verunreinigungen, die die PCR zunichte machen können.

Wir haben durch Experimente herausgefunden, daß wenn ein auf Wasser basierender Reagens auf der Probe vorgesehen ist und ein Deckel aus Kunststoff auf der Probe angebracht und mit Hilfe von Klebstoff an den Ecken oder Kanten an dem Objektträger befestigt wird, die Oberflächenspannung und die Elution von Gas den flüssigen Reagens während der Wechselbehandlung bewegen. Deshalb sind diese Verfahren nicht immer völlig verlässlich. Dabei ist es allgemein erforderlich, daß der Objektträger horizontal angeordnet wird, wodurch die Möglichkeiten der Anordnung in einer Thermozykluseinrichtung beschränkt werden. Bemühungen, das Reagens unter einem Deckel zu dichten, indem sein Durchmesser vollständig mit einem dichtenden Klebstoff umgeben wird, sind häufig nicht erfolgreich, weil eine Gasdichtung mit Klebstoff alleine schwierig oder unmöglich aufrechtzuerhalten ist. Außerdem ist die Oberfläche des Objektträgers gewöhnlich mit einer dünnen Schicht der Probe unter wenigstens einem Teil des Deckelumfangs bedeckt, wodurch eine schlechte Haftung auf dem Objektträger verursacht wird.

Dementsprechend besteht ein Bedarf für ein neues und verbessertes vollständiges Probenhaltesystem zum Durchführen einer in-situ-PCR. Es besteht ein Bedarf für ein System, das ein praktisches physikalisches Halten des Reagens auf einer Probe vorsieht und das das Verdampfen des Reagens und der Probe während der thermischen Wechselbehandlung verhindert. Es besteht weiterhin ein Bedarf für ein System, das die Verwendung von Öl überflüssig macht, keinen Klebstoff verwendet und keine horizontale Anordnung des Objektträgers während der thermischen Wechselbehandlung erfordert.

Zusammenfassung der Erfindung

Die vorliegende Erfindung erfüllt den oben genannten Bedarf durch eine Halteanordnung nach Anspruch 1, ein System für die PCR-Amplifikation nach Anspruch 22 sowie eine

Vorrichtung zum Anordnen einer in-situ-PCR-Probe und eine Halteanordnung nach Anspruch 42.

Das Haltesystem in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung umfaßt einen herkömmlichen Objekträger aus Glas mit einer darauf angebrachten Gewebeprobe, die eine Ziel-Nukleinsäure umfaßt, ein flexibles Deckelglied über der Probe sowie eine Halteanordnung, die mechanisch an dem Objekträger befestigt ist, um ein Reagens auf der Probe auf dem Objekträger unter dem Deckel zu halten.

In dem System in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung wird das Reagens durch eine dünnen, flexiblen Deckel in Kontakt mit dem ausgewählten Teil der Probe gehalten, wobei der flexible Deckel mechanisch gegen den Objekträger geklemmt wird. Dieser Deckel kann lichtundurchlässig oder transparent sein, da das Reagens während des Anordnens vorzugsweise durch das Glas und nicht durch den Deckel betrachtet wird, und muß inaktiv gegenüber den PCR-Reagenzien und der Probe sein. Ein im wesentlichen kreisförmiger Dichtungsring um den Umfang des Deckels preßt den Deckel gegen den Objekträger, um eine hermetische Dichtung aufrechtzuerhalten. Der Druck wird durch eine Anordnung aus einer Federklemme und einem Querträger aufrechterhalten. Die amplifizierte Probe auf dem Objekträger wird auf herkömmliche Weise durch ein Mikroskop betrachtet, nachdem der Deckel und seine Halteinrichtung entfernt wurden.

Das System macht die Anordnung der gesamten Reaktion auf dem Objekträger schnell, bequem und wiederholbar, wobei eine minimale Geschicklichkeit erforderlich ist. Die Anordnungsprozedur kann einfach mit physikalischen Heißstarts verwendet werden. Schließlich kann das System einfach mit herkömmlichen Feststellungstechniken verwendet werden.

Diese und andere Merkmale, Aufgaben und Vorteile der vorliegenden Erfindung werden durch die folgende Beschreibung verdeutlicht, die auf die beigefügten Zeichnungen Bezug nimmt.

Kurzbeschreibung der Zeichnungen

Fig. 1 ist eine perspektivische Ansicht eines Probenhaltesystems in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung.

Fig. 2 ist eine Explosionsansicht der Systemanordnung von Fig. 1, die hier auf den Kopf gestellt, d.h. in der beim Anordnen verwendeten Lage gezeigt ist.

Fig. 3 ist eine vergrößerte Teilansicht von oben der Anordnung von Fig. 1, die hier auf den Kopf gestellt gezeigt ist.

Fig. 4 ist eine Querschnittsansicht der Anordnung entlang der Linie 4-4 von Fig. 3.

Fig. 5 ist eine Querschnittsansicht der Anordnung entlang der Linie 5-5 von Fig. 3.

Fig. 6 ist eine Endansicht einer der Federklemmen in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung.

Fig. 7 ist eine Ansicht von oben auf die in Fig. 6 gezeigte Federklemme.

Fig. 8 ist eine Ansicht von unten eines bevorzugten Querträgers, der in der Anordnung in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung verwendet wird.

Fig. 9 ist eine Seitenansicht des in Fig. 8 gezeigten Querträgers.

Fig. 10 ist eine Querschnittsansicht des Querträgers von Fig. 8 entlang der Linie 10-10

Fig. 11 ist eine perspektivische Ansicht einer Vorrichtung für die manuelle Anordnung für das Haltesystem der vorliegenden Erfindung.

Fig. 12 ist eine perspektivische Ansicht einer mechanischen Anordnungseinrichtung für das Haltesystem in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung.

Fig. 13 ist eine perspektivische Ansicht der von der Vorrichtung von Fig. 12 getrennten Zangenanordnung.

Fig. 14 ist eine Ansicht von oben auf eine Anpassungsplatte mit Nuten für eine bestehende Thermozykluseinrichtung.

Fig. 15 ist eine Schnittansicht der Anpassungsplatte mit Nuten von Fig. 14.

Fig. 16 ist eine perspektivische Ansicht einer Thermozykluseinrichtung mit einem modifizierten Wärmetauschblock, der dafür angepaßt ist, die Probenhaltesysteme in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung aufzunehmen.

Fig. 17 ist eine vergrößerte Teilschnittansicht des Wärmetauschblocks der in Fig. 16 gezeigten Thermozykluseinrichtung.

Fig. 18 ist eine Ansicht von oben einer ersten alternativen Ausführungsform des Querträgers und des Deckels in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung.

Fig. 19 ist eine Ansicht von oben einer zweiten alternativen Ausführungsform des Querträgers und des Deckels in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung.

Fig. 20 ist eine Schnittansicht des angeordneten Haltesystems in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung, das einen alternativen Querträger und einen alternativen Deckel von Fig. 18 oder 19 umfaßt.

Fig. 21 ist eine vergrößerte Teilschnittansicht des in Fig. 20 gezeigten Haltesystems entlang der Linie 21-21.

Fig. 22 ist eine Ansicht von oben eines Haltesystems, das in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung auf einem Objektträger angeordnet ist und eine dritte alternative bevorzugte Ausführungsform des Querträgers und des Deckels verwendet.

Fig. 23 ist eine Teilschnittansicht der in Fig. 22 gezeigten vorliegenden Erfindung entlang der Linie 23-23.

Fig. 24 ist eine Teilschnittansicht der in Fig. 22 gezeigten vorliegenden Erfindung entlang der Linie 24-24.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

Fig. 1 zeigt das Haltesystem 10 in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung zum Halten einer Probe 12, die eine Ziel-Nukleinsäure enthält, und eines auf der Probe aufgebrachten Reagens 13 auf einem Objektträger 14 aus Glas. Das System 10 umfaßt den

Objektträger 14 aus Glas, ein im wesentlichen flexibles Deckelglied 16 über der Probe 12 sowie eine Halteeinrichtung 18, die den Deckel 16 auf dem Objektträger 14 befestigt.

Diese Systemanordnung 10 ist perspektivisch in Fig. 1 gezeigt. Fig. 2 zeigt eine Explosionsansicht der einzelnen Teile, und Fig. 3 zeigt eine vergrößerte Ansicht von oben des in Fig. 1 gezeigten angeordneten Systems. Fig. 4 und 5 zeigen Querschnittsansichten des Systems 10 von Fig. 3.

Das Reagens 13, ungefähr ein Tropfen, ist durch eine flexibles Dichtungsglied oder eine Dichtung entlang des Umfangs dicht in dem Volumen zwischen dem Deckel 16 und dem Objektträger 14 eingeschlossen. Das Dichtungsglied kann ein separates Teil oder ein einstückig mit dem Deckel 16 ausgebildeter Teil sein. Die Dichtung ist vorzugsweise als flexibler Randteil 19 des Deckelgliedes 16 vorgesehen, das aus einem Elastomer hergestellt ist, das chemisch mit den PCR-Reagenzien kompatibel ist. In der bevorzugten Ausführungsform ist das Deckelglied 16 aus Silikonkautschuk hergestellt. Die Dichtung ist breit genug und wird durch einen starren Dichtungsring 20 mit ausreichender Kraft pro Fläche gegen den Objektträger 14 gedrückt, so daß auch dann nur wenig Wasser, Flüssigkeit oder Dampf während der thermischen Wechselbehandlung aus dem Raum unter dem Deckel 16 entweichen kann, wenn die Oberfläche des Objektträgers unter dem Dichtungsring mit einer dünnen Schicht von Zellen oder Gewebe der Probe 12 bedeckt ist. Die Dichtung soll auch bei Kochtemperaturen aufrechterhalten werden.

Der flexible Deckel ist derart geformt, daß er im entspannten Zustand auf der das Reagens berührenden Seite leicht konkav ist. Der gewählte Grad der Höhlung definiert das Volumen 13, das zwischen dem Deckel 16 und dem Objektträger vorgesehen ist, wenn der Dichtungsring 20 den Randteil 19 des Deckels 16 gegen den Objektträger 14 drückt. Typischerweise beträgt das Volumen bei einem kreisförmigen Deckel mit einem Durchmesser von 12 mm ungefähr 10 Mikroliter. Das Volumen wird wie folgt gewählt. Wenn das Volumen zu groß gewählt wird, ist die erforderliche Menge des Reagens unnötig teuer und braucht länger, um sich zu erwärmen oder abzukühlen. Wenn das Volumen zu klein ist, ist das Verhältnis zwischen Oberfläche und Volumen unter dem Deckel unvorteilhaft groß, was das Risiko einer schlechten Amplifikation wegen der Adsorption der Enzyme auf den Oberflächen oder einer Vergiftung des Reagens 13 durch Spuren von hindernden Verunreinigungen auf den Teilen oder auf der Probe 12 erhöht.

Typischerweise ist der Durchmesser des interessanten Bereichs der zu untersuchenden Probe 12 nicht größer als 10 mm. Der freie Bereich des Objekträgers ist ungefähr 25 mm mal 57 mm groß, weil ein Ende gewöhnlich für die Etikettierung reserviert ist. Da es ziemlich schwierig ist, einen Gewebeschnitt mit einer Dicke von nur wenigen Mikrometern präzise auf einer vorbestimmten Position auf dem Objekträger zu plazieren, ist es vorzuziehen, den Deckel 16 so auszubilden, daß er an einer beliebigen Position auf dem freien Bereich angeordnet werden kann. Es können auch mehr als ein interessanter Bereich auf einem Objekträger vorhanden sein, so daß es von Vorteil ist, wenn wie in Fig. 1 gezeigt mehr als eine Probe und mehr als ein System 10 auf einem Objekträger angeordnet werden können.

Die neuartige Halteanordnung 18 zum Klemmen des Deckels 16 auf den Objekträger 14 erlaubt eine stark variable Position des Deckels 16. An einer beliebigen Position innerhalb eines wenigen Millimeter breiten Randes an den Kanten des freien Bereichs auf dem Objekträger positionierte Proben können gehalten und amplifiziert werden. Der wenige Millimeter breite Rand wird für den Dichtungsring 20 benötigt. Der Randteil 19 des Deckels 16 wird durch den starren Dichtungsring 20 um seinen Umfang herum verstärkt, so daß wenn der Dichtungsring 20 an zwei gegenüberliegenden Kanten des Deckels gegen den Objekträger 14 gedrückt wird, um dieselben adäquat zu dichten, dann auch allen anderen Teile entlang des Umfangs des Deckels adäquat gedichtet sind. Der starre Dichtungsring 20 erlegt also die Beschränkung auf, daß der Umfang des Deckels in einer Ebene liegt.

Der Deckel 16 ist vorzugsweise eine kreisförmige Scheibe aus einem dünnen Gummifolienmaterial. Der starre Dichtungsring 20 aus nichtrostendem Stahl ist mit dem Rand 19 des Gummideckels 16 verbunden. Der Ring 20 kann einen rechteckigen, trapezförmigen, dreieckigen oder anderen vieleckigen Querschnitt aufweisen, so daß wenigstens eine flache Seite für die Verbindung mit dem Deckel 16 vorgesehen ist. Vorzugsweise weist der Ring 20 eine rechteckigen oder trapezförmigen Querschnitt auf. Auch ein „D“-förmiger Querschnitt ist möglich. Außerdem muß der Ring nicht rund sein. Er kann rechteckig sein oder eine andere kontinuierliche Form aufweisen, solange der Deckel 16 eine dichte Verbindung mit der Oberfläche des Objekträgers herstellen kann. Der mit dem Stahlring 20 verbundene Rand 19 des Gummischeiben-Deckels 16 bildet auf diese Weise eine mit dem Rest der Scheibe kontinuierliche Dichtung. Diese Ausführungsform erfordert, daß der dünne Gummideckel 16 undurchlässig für die Diffusion von Wasserdampf und gleichzeitig gegenüber den PCR-Reagenzien nicht feindlich ist. Silikonkautschuk ist zwar der PCR gegenüber nicht feindlich, ist jedoch für Wasserdampf zu durchlässig. Dementsprechend ist wie in Fig. 4 und 5 gezeigt entweder eine Sandwich-Schichtung oder ein Kompositmaterial aus einem nicht feindlichen

Elastomer wie Silikonkautschuk und einem nicht durchlässigen Elastomer wie Polypropylen oder eine nicht feindliche Beschichtung 21 wie Parylen D von Union Carbide auf wenigstens einem Teil der Unterseite einer nicht durchlässigen Elastomerschicht als Material für den Deckel vorzuziehen.

Die erforderliche konkave Form des Deckels 16 kann entweder während des Gießens, durch das Verformen des flachen Deckels 16 während des Verbindens mit dem starren Ring 20 oder durch das Verbinden der Außenoberfläche des Deckels 16 mit einem am Ring 20 vorgesehenen Querstück (nicht gezeigt) erreicht werden, der das Zentrum der Scheibe leicht aus der Ebene des Rings 20 hält.

Der Deckel 16 wird durch einen starren Querträger 22 mit parallelen Schienen 24, die nur gegenüberliegende Teile des Dichtungsring 20 berühren, gegen den Objektträger 14 gehalten. Die Schienen 24 des Querträgers 22 erstrecken sich von einer Kante zur anderen über den Objektträger. Der Deckel 16 kann also wie in Fig. 3 gezeigt an einer beliebigen Position auf dem Querträger 22 angeordnet werden. Weiterhin kann der Querträger 22 an einer beliebigen Position entlang der Länge des Objektträgers festgeklemmt werden. Deshalb kann der Deckel 16 in der vorliegenden Erfindung an einer beliebigen Position innerhalb des freien Bereichs auf dem Objektträger angeordnet werden.

Die Schienen 24 des Querträgers 22 weisen vorzugsweise wie in Fig. 5 gezeigt einen L-förmigen Querschnitt auf, um die Stärke zu verbessern. Die Schienen 24 werden über flache Enden 26 verbunden, die wie in Fig. 1, 3 und 4 gezeigt mit Hilfe von zwei Klemmen 28 auf dem Objektträger 14 festgeklemmt werden. Diese Klemmen 28 erstrecken sich jeweils über die langen Kanten zur Rückseite 30 des Objektträgers 14, d.h. zu der Oberfläche gegenüber der die Probe 12 tragenden Oberfläche. Jedes Ende 26 des Querträgers 22 ist leicht gebogen, um eine geneigte Ebene zu bilden. Wenn die Klemmen 28 in Position geschoben werden, gleiten sie auf diesen Enden 26 mit den geneigten Ebenen und üben eine wesentliche Druckkraft auf den Querträger 22 und den Dichtungsring 20 aus, so daß der Randteil 19 des Deckels 16 gegen den Objektträger 14 gedrückt wird.

Obwohl die Klemmen 28 und der Querträger 22 aus einem relativ dünnen Material hergestellt werden können, etwa aus nichtrostendem Stahl, müssen sie ausreichend starr sein, so daß sie sich während des Anordnens lediglich geringfügig biegen. Die gespeicherte Energie für die Klemmkraft stammt vorzugsweise größtenteils aus dem Zusammendrücken der Gummidichtung (des Randes 19 des Deckels unter dem Dichtungsring 20) und nicht aus

dem Biegen des Querträgers 22 oder der Klemmen 28. Die vorteilhafte Folge davon ist, daß die Schienen 24 des Querträgers 22 unabhängig davon, wo der Deckel 16 auf dem Objekträger positioniert ist, immer parallel zu dem Objekträger angeordnet sind, so daß der Rand 19 entlang seines gesamten Umfangs gleichmäßig mit derselben Kraft zusammengedrückt wird. Der Querträger 22 und die Klemmen 28, die den Deckel 16 auf dem Objekträger 14 festklemmen, sind ausreichend starr, um dem durch das Erwärmen des Reagens 13 auf beinahe Kochtemperatur erzeugten Druckanstieg standzuhalten. Die Flexibilität des Deckels reduziert erheblich den maximalen Druck, der unter dem Deckel auftreten kann. Außerdem wirkt der flexible Deckel 16 der Fluidexpansion während des Erwärmens entgegen, ohne daß der Objekträger 14 gebrochen wird, der das eingeschlossene Volumen effektiv unter Druck setzt. Dadurch kann eine Blasenbildung im Reagens 13 während der thermischen Wechselbehandlung verhindert oder wenigstens minimiert werden, wobei die Unabhängigkeit des Haltesystems der vorliegenden Erfindung von der absoluten Höhe genutzt wird. Die durch den Querträger auf den Ring ausgeübte Kompressionskraft liegt im Bereich von vier Pfund (17,8 N) und hat eine Kompression des Gummirandes 19 von ungefähr 20% zur Folge.

In Fig. 6 und 7 sind jeweils eine Draufsicht und eine Endansicht einer der Klemmen 28 gezeigt. Die Klemme 28 ist ein Stück Metallblech aus nichtrostendem Stahl, das in eine „J“-Form gebogen ist, um eine lange Seite 32, eine kurze Seite 34 sowie eine verbindende senkrechte Seite 36 vorzusehen. Die Seite 32 kann ein Paar von Dellen 38 aufweisen, die zu der kurzen Seite 34 hin vorstehen. Diese Dellen sind derart zueinander beabstandet, daß sie die Innenkante des Endes 26 mit der geneigten Ebene des Querträgers 22 kontaktieren und über dieselbe schnappen, um die Klemme 28, den Querträger 22 und den Objekträger 14 wie in Fig. 1 und 4 gezeigt zusammenzuhalten. Alternativ dazu kann die Funktion der Dellen 38 durch eine erhobenen Grat oder einen anderen Sperrmechanismus zwischen den ineinandergrifenden Anordnungsteilen 18 erfüllt werden.

Eine alternative bevorzugte Ausführungsform des Querträgers 22 ist in Fig. 8, 9 und 10 gezeigt. Der Querträger 22a ist im wesentlichen ein gestanzter rechteckiger Metallblechkörper, der zwei parallele Schienen 24a bildet, die durch Querenden 26a verbunden werden. Die Schienen 24a des Querträgers 22a weisen wie in Fig. 10 gezeigt einen L-förmigen Querschnitt auf. Bei der Anordnung werden die Schienen 24a zusammen mit den flachen Enden 26a wie oben beschrieben auf dem Objekträger 14 festgeklemmt. Der grundsätzliche Unterschied zu dem ersten in Fig. 3 gezeigten Querträger besteht darin, daß die Enden 26a in einer doppelten Biegung 27a mit den Schienen 24a verbunden werden. Die doppelte

Biegung 27a erlaubt es, daß das lange Bein der Klemme 28 unter Reibung mit der Oberfläche des Endes 26a verbunden wird. Die doppelte Biegung 27a erzeugt auch beinahe eine Stufe, so daß die Gesamtdicke der Anordnung des Objektträgers und des Deckels minimiert ist, wenn die Klemme 28 angebracht ist.

Eine Neigung von ungefähr 3° an den Enden 26a reicht aus, um die notwendige Greifkraft zwischen den Trägerenden 26a, dem Objektträger 14 und der Klemme 28 vorzusehen und um einen ausreichenden Druck auf den starren Ring 20 auszuüben. Wenn der in den Fig. 8 bis 10 gezeigte alternative Träger verwendet wird, dann sind keine Dellen 38 auf den Klemmen 28 erforderlich.

Da der Deckel 16 nicht größer ist als erforderlich, ist das Volumen des Reagens nicht größer als erforderlich, so daß die zum Herstellen einer leckgeschützten Dichtung erforderliche Kraft minimiert ist. Alle diese Eigenschaften sind vorteilhaft. Es ist vorteilhaft, daß keine große Dichtkraft erforderlich ist, weil es das Anordnen einfacher macht. Außerdem würde ein zum starren Aushalten einer größeren Kraft erforderlicher Mechanismus die Anordnung unnötig dick und massiv machen. Dadurch würde wiederum die Anzahl der gleichzeitig in einer Zykluseinrichtung unterzubringenden Objektträger beschränkt werden, wenn diese Kante an Kante angeordnet werden. Weiterhin würde auch die thermische Zeitkonstante der Anordnung erhöht werden und dadurch der Zyklusprozeß verlangsamt werden.

Das Anordnen eines Objektträgers für die in-situ-PCR

Das Anordnen des vollständigen Haltesystems 10 auf einem Objektträger 14 mit einem unter einem Deckel 16 plazierten Reagens 13 wird durch eine einzigartige Prozedur bewerkstelligt, die auch Teil der vorliegenden Erfindung ist. In einer bevorzugten Ausführungsform wird eine Vorrichtung 40 für das manuelle Anordnen verwendet. Diese Vorrichtung 40 ist in Fig. 11 gezeigt. In einer anderen bevorzugten Ausführungsform wird eine mechanisch unterstützte Anordnungsvorrichtung bzw. ein mechanisch unterstütztes Anordnungswerkzeug verwendet. Ein derartiges Werkzeug ist in Fig. 12 gezeigt.

Die in Fig. 11 gezeigte Vorrichtung 40 für das manuelle Anordnen besteht aus einem auf einer Grundplatte 45 befestigten Anordnungspfosten 42 und einer beweglich auf der Grundplatte 45 befestigten Objektträgerführung 44. Die Objektträgerführung 44 ist nach oben federvorgespannt, um sich vertikal um den Pfosten 42 zu bewegen. Die Oberseite des Pfostens 42 weist Vertiefungsbereiche 46 und 48 auf, die derart geformt sind, daß sie die

Klemmen 28 und den Querträger 22 lose aufnehmen, um diese für das Anordnen auf dem Objekträger 14 in Position zu halten. Der Pfosten 42 weist auch einen zentralen Luftdurchgang 43 auf.

Die Objekträgerführung 44 ist ein U-förmiger Körper, der zwei im wesentlichen flache Plattenteile 50 aufweist, die neben gegenüberliegenden Seiten des Pfostens 42 angeordnet sind. Diese Plattenteile 50 weisen einen Kanal auf, der zum Aufnehmen eines dem Standard entsprechenden Mikroskop-Objekträgers dimensioniert ist. Die zwei Plattenteile 50 sind durch ein einstückig damit ausgebildetes U-förmiges Joch 52 miteinander verbunden. Jeder Plattenteil 50 weist eine Muffe 54 auf, die an seiner Unterseite befestigt ist und über einen entsprechenden auf der Grundplatte 45 befestigten Stift 56 gleitet. Um die Stifte 56 sind Federn 58 befestigt, die die Führung nach oben zu einer Position vorspannen, in der der durch die Plattenteile 44 gehaltene Objekträger 14 über den Vertiefungsbereichen 46 und 48 in der Oberseite des Pfostens 42 positioniert ist.

Das Anordnen des Haltesystems 10 wird wie folgt vorgenommen. Zuerst werden zwei Klemmen 28 in die Vertiefungsbereiche 46 auf der Oberseite des Pfostens 42 mit ihren langen Seiten 32 nach unten gegen den Pfosten 42 gelegt. Dann werden sie derart positioniert, daß der Raum zwischen ihren gegenüberliegenden kurzen Seiten 34 gerade etwas breiter ist als die Breite eines Standard-Mikroskop-Objekträgers 1. Als nächstes wird der Querträger 22 auf den Anordnungspfosten zwischen die Vertiefungen 46 wie in Fig. 2 gezeigt mit den Schienenkanten nach oben und den Schienen 24 in den Vertiefungsbereichen 48 plaziert. Die Dimensionen der verschiedenen Teile sind derart, daß jeweils ein Teil der geneigten Ebenen der Enden 26 des Querträgers 22 auf der Oberseite der langen Seiten 32 der Klemmen 28 liegt. Auf diese Weise wird die anfängliche Verbindung der Klemmen 28 mit dem Querträger 22 hergestellt.

Alternativ dazu kann eine zuvor angeordnete Kombination aus dem Querträger 22 und den zwei Klemmen 28, die durch einen schwachen Klebstoff verbunden und in der richtig beabstandeten Anfangsbeziehung gehalten werden, vorgesehen werden, um den Aufwand bei der Vorbereitung der Anordnung 18 zu reduzieren. Wenn die Klemmen 28 aus einem magnetischen nichtrostenden Stahl hergestellt sind, können weiterhin im Anordnungspfosten eingebettete kleine Dauermagneten die Klemmen mit minimalem Aufwand automatisch richtig positionieren.

Als nächstes wird der Deckel 16 mit dem am Randteil 19 angebrachten Dichtungsring 20 auf und zwischen die Schienen 24 des Querträgers 22 plaziert, wobei die konkave Dichtungsseite des Deckels 16 nach oben angeordnet ist und der Dichtungsring 20 auf den Schienen 24 des Querträgers 22 ruht. Der Deckel 16 wird dann derart positioniert, daß er unter dem interessanten Bereich (mit der Probe) auf dem Objekträger 14 zentriert ist. Der Deckel ist derart dimensioniert, daß sein Rand 19 (d.h. die Dichtoberfläche) weiter über die Schienen des Querträgers 22 vorsteht als die Dichtung bei der Anordnung zusammengedrückt wird, so daß der Querträger 22 vorzugsweise auch nach dem Zusammendrücken des Randes 19 den Objekträger 14 aus Glas nicht tatsächlich berührt, wie in Fig. 4 und 5 gezeigt.

Ein Tröpfchen des Reagens 13 wird dann auf den Deckel 16 gegeben. Eine zum Ausgeben des gewünschten Reagensvolumens eingestellte Pipette wird vorzugsweise manuell verwendet, um das Reagens als Tröpfchen nahe dem Zentrum der konkaven Oberfläche auszugeben. Da die Oberfläche des Deckels nur zum Teil benetzbar ist, breitet sich das Tröpfchen nicht wesentlich aus. Es steht deutlich nach oben über den Rand 19 des Deckels 16 vor.

Der Objekträger 14 mit wenigstens einer zuvor auf demselben angebrachten Probe 12 wird dann auf die Objekträgerführung 44 der Anordnungsvorrichtung 40 mit der Probenseite nach unten direkt über dem Reagenströpfchen 13 plaziert. Die Objekträgerführung ist zu Beginn derart positioniert, daß der Boden des Objekträgers durch die Federn 58 immer wenigstens einige Millimeter über der Oberseite des Reagenströpfchens 13 gehalten wird. Der Objekträger 14 wird positioniert, indem er in seiner Längsrichtung verschoben wird, um den zu verarbeitenden Probenbereich über dem Tröpfchen auf dem Deckel 16 zu zentrieren. Dies kann vorgenommen werden, indem durch die Rückseite des (auf dem Kopf stehenden) Objekträgers 14 geblickt wird, was dadurch erleichtert werden kann, daß der interessante Bereich durch eine Markierung auf der Rückseite 30 des Objekträgers 14 angegeben wird.

Als nächstes legt der Benutzer einen Finger (im Handschuh) direkt über dem Anordnungs-pfosten 42 auf die Rückseite 30 des Objekträgers 14 und übt einen direkt nach unten gerichteten Druck aus, der ausreicht, um die nach oben drückende Kraft der Federn 58 zu überwinden und die Objekträgerführung 44 nach unten zu bewegen. Dadurch wird die Probenseite des Objekträgers 14 in Kontakt mit dem Reagenströpfchen 13 gebracht und wird das Tröpfchen 13 über den Objekträger 14 und die Deckeloberfläche innerhalb des Randes 19 verteilt. Das Volumen des Reagenströpfchens wird so gewählt, daß es etwas größer als das Volumen zwischen der konkaven Oberfläche des Deckels 16 und der Ebene seines Randes 19 (der Oberfläche des Objekträgers) ist. Deshalb erreicht das Tröpfchen 13 die Kante des

Randes 19 und überschreitet dieselbe kurz bevor die Objektträgeroberfläche den Rand 19 kontaktiert. Dadurch wird alle oder beinahe alle Luft aus dem Raum unterhalb des Deckels 16 verdrängt, bevor der Objektträger 14 und der Deckelrand 19 eine Dichtung bilden. Es ist akzeptabel, daß ein kleines überschüssiges Volumen des Reagens über den Rand 19 des Deckels 16 gedrängt wird, da dieses während des weiteren Prozesses trocknet. Die nach unten auf den Objektträger 14 gerichtete Kraft beginnt nun den Rand 19 zusammenzudrücken.

Wenn der Rand 19 teilweise zusammengedrückt wurde, sollte die Rückseite 30 des Objektträgers 14 gerade bei oder gerade unterhalb der Bodenkante der kurzen Seite 34 jeder der Klemmen 28 sein. Zu diesem Zeitpunkt verwendet der Bediener die (durch einen Handschuh bedeckten) Daumen und Finger seiner anderen Hand, um die zwei Klemmen 28 zueinander über die Kanten des Objektträgers 14 und über die Enden 26 des Querträgers 22 zu schieben, bis die Klemmen 28 mit ihren vertikalen Verbindungsseiten 36 gegen die Kanten des Objektträgers 14 stoßen. Durch diese Tätigkeit wird der Rand 19 des Deckels weiter zusammengedrückt. Wegen der kleinen Rasteinrichtungen 38, die in die Enden 26 des Querträgers 22 greifen, und/oder weil die Tangente des Winkels der geneigten Ebenen der Querträgerenden 26 kleiner ist als der Reibungsfaktor zwischen der Klemme 28 und dem Querträgerende 26, bleibt die Klemme 28 in dieser Position, bis sie absichtlich wieder entfernt wird.

Bei dem angeordneten System 10 in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung ist das zwischen dem Objektträger 14 und dem Deckel 16 eingeschlossene Volumen vollständig mit der nicht komprimierbaren Reagensflüssigkeit 13 gefüllt. Wenn also der Randteil 19 des Deckels 16 vollständig zusammengedrückt wird, ist der Deckel selbst vorzugsweise flexibel, so daß er sich dem festen Reagensvolumen ohne einen wesentlichen Druckanstieg anpassen kann, der die Anordnung schwierig machen würde. Ein anderer Grund dafür, daß der Deckel flexibel sein sollte, besteht darin, daß das Reagens 13 auf eine Temperatur erwärmt wird, die sich dem Kochpunkt annähert oder denselben überschreitet, und dabei expandiert, so daß der Dampfdruck steigt und im Reagens gelöste Gase aus der Lösung austreten. Wenn der Deckel überhaupt nicht flexibel wäre, könnte der Druck in seinem Inneren so hoch steigen, daß er den Objektträger oder den Deckel brechen und einen Verlust des Reagens verursachen könnte. Bereits eine geringe Flexibilität reicht aus, um sich dem Volumen von sich bildenden Gasblasen anzupassen und einen zu hohen Druckanstieg zu verhindern. Der Druck steigt dabei allgemein nur etwas mehr als der Reagens-Dampfüberdruck gegenüber dem externen Atmosphärendruck. Dadurch wird sichergestellt, daß das System

auch bei hohen absoluten Höhen gut arbeitet, bei denen der Kochpunkt des freien Reagens niedriger ist als die PCR-Denaturierungstemperatur.

Ein mechanisch unterstützte Vorrichtung bzw. ein mechanisch unterstütztes Werkzeug 80 für das Anordnen ist in Fig. 12 gezeigt. Dieses Werkzeug ist dem in Fig. 11 gezeigten Werkzeug ähnlich, wobei jedoch die Handhabung der Anordnung mit den Fingern praktisch überflüssig gemacht wurde. Das Werkzeug 80 ist vorzuziehen, insbesondere wenn physikalisch heiße Starts (weiter unten ausführlich beschrieben) vorgenommen werden. Das in Fig. 12 gezeigte Werkzeug 80 weist wie in Fig. 11 eine Grundplatte 45 und einen auf derselben befestigen Pfosten 42 auf und verwendet eine Objektträgerführung 82, die der in Fig. 11 gezeigten Führung 44 ähnlich ist. Außerdem weist das Werkzeug 80 einen Kompressionsarm 84 und einen Klemmeninstallationsmechanismus 86 auf, so daß der Benutzer während des Anordnens keine physikalisch heißen Komponenten der Halteanordnung 18 berühren muß.

Die Objektträgerführung 82 weist ein Paar von beabstandeten flachen Plattenteilen 88 auf, die für das Aufnehmen eines Objektträgers 14 dimensioniert sind. Die Plattenteile werden durch ein einstückig damit ausgebildetes U-förmiges Joch 90 miteinander verbunden, das sich um einen horizontalen Drehzapfen 92 dreht. Der Drehzapfen 92 wird horizontal über der Grundplatte 45 durch zwei fixierte Stützen 94 ungefähr auf der Höhe der Oberseite des Pfostens 42 gehalten.

Ein Ende des Kompressionsarm 84 wird ebenfalls schwenkbar innerhalb des Jochs 90 auf dem Zapfen 92 gehalten. Der Arm 84 ist ein flaches und längliches Glied mit einer im wesentlichen rechteckigen Öffnung 96, die über der Oberseite des Pfostens 42 angeordnet ist, der den Querträger 22 und die Klemmen 28 aufnimmt und hält. Die Öffnung 42 erlaubt das Betrachten des Deckelglieds 16, des Querträgers 22 und der Probe 12 auf dem Objektträger 14, wenn der Arm über dem Pfosten 42 auf den Objektträger 14 gesenkt wird. Ein die Öffnung 96 umgebendes Polsterkissen 98 aus Gummi wird verwendet, um das Brechen des Objektträgers 14 zu verhindern, wenn der Arm 94 gegen denselben gedrückt wird. Der Arm ist vorzugsweise nach oben federvorgespannt, um ihn aus dem Weg zu halten, bis er benötigt wird. Die Objektträgerführung 82 ist entsprechend nach oben federvorgespannt, um den Objektträger 14 über dem Querträger 22, den Klemmen 28, dem Deckelglied 16 und dem Reagenströpfchen 13 zu halten, bis der Arm 94 für die Endinstallation der Halteanordnung 18 auf den Objektträger 14 gesenkt wird. Der Arm 84 und die Objektträgerführung 82 können herkömmliche Federn (nicht gezeigt) umfassen, die auf dem Zapfen 90 befestigt

sind oder sich von der Grundplatte 45 erstrecken, um die gewünschte nach oben gerichtete Vorspannung vorzusehen.

Der Klemmeninstallationsmechanismus 86 ist vorzugsweise eine federbelastete Zange 100, die auf dem Posten 42 befestigt ist und zwei gegenüberliegende Finger 102, die sich zu einem Vertiefungsbereich 46 biegen um jeweils eine Klemme 28 an der Kante des auf der Führung 82 befestigten Objekträgers 14 zu positionieren, sowie einstückig damit ausgebildete gegenüberliegende Griffteile 104 umfaßt. Die gegenüberliegenden Griffteile 104 der Zange 100 werden manuell zusammengedrückt, um die Klemmen 28 auf die Seiten des Objekträgers, über die Kanten des Objekträgers und die Enden 26 des Querträgers 22 zum Abschließen der Anordnung des Haltesystems 10 zu schieben. Die Zangenarme 100 sind schwenkbar auf einem stationären Schwenkzapfen 106 befestigt, der direkt unter dem Kontakt zwischen den Fingern 102 und den Klemmen 28 von den Seiten des Pfostens 42 vorsteht.

Der Klemmeninstallationsmechanismus 84 ist separat in der perspektivischen Ansicht von Fig. 13 gezeigt. Jeder L-förmige Finger 102 weist ein kurzes Bein auf, das in einen der Vertiefungsbereiche 46 an der Oberseite des Pfostens 42 paßt. Jeder flache Griffteil 104 fügt sich um zwei benachbarte Seiten des Pfostens 42. Zwischen den Griffteilen 104 und dem Posten 42 (nicht gezeigt) positionierte Federn (nicht gezeigt) spannen die Griffteile 104 und damit die Fingerteile 102 der Zange 100 nach außen vor, um das Einsetzen der Halteklemmen 28 in die Vertiefungen 46 zu gestatten. Wenn die gegenüberliegenden Griffteile 104 zusammengedrückt werden, bewegen sich die Spitzen 102 zueinander und schieben die Klemmen 28 auf den Objekträger.

Das Werkzeug 80 wird wie folgt betätigt. Zwei Klemmen 28 werden wie zuvor beschrieben in den Vertiefungen 46 eingesetzt. Der Querträger 22, der Dichtungsring 20, der Deckel 16 und das Reagens 13 werden nacheinander auf dem Pfosten platziert, wobei dann ein Objekträger 14 mit einer darauf angebrachten Probe 12 auf den Plattenteil 86 der Führung 82 mit der Probenseite nach unten gelegt wird und die Probe vertikal über dem Reagens 13 im Deckel 16 positioniert wird. Der Kompressionsarm 94 wird dann nach unten gegen den Objekträger geschwenkt, um den Objekträger 14 auf den Deckel zu senken und um das Reagens und das Enzym über die Probe auf dem Objekträger 14 zu verteilen. Wenn der Arm 94 vollständig gesenkt ist, wird die Zange 100 zusammengedrückt, werden die Finger 102 zueinander bewegt und werden die Halteklemmen 28 auf den Objekträger 14 und über die Träger-

enden 26 geschoben. Die vollständige Objekträgeranordnung 10 wird dann aus dem Werkzeug 80 genommen und wie weiter oben beschrieben thermisch wechselbehandelt.

Anwendungen mit heißem Start

Um mit der vorliegenden Erfindung heiße Starts zu implementieren, ist es lediglich erforderlich, ein Heizsystem zu der manuellen Anordnungsvorrichtung 40 oder zu dem mechanisch unterstützen Werkzeug 80 hinzuzufügen, wobei erwärmte Behälter zum Halten der Systemkomponenten verwendet werden. Außerdem können wie weiter oben genannt einige der Komponenten des Objekträger-Haltesystems vorübergehend miteinander verbunden und erwärmt werden, bevor sie in die Vorrichtung gegeben und mit den restlichen Komponenten des Haltesystems verbunden werden.

Die folgende Beschreibung bezieht sich auf die in Fig. 11 gezeigte manuelle Anordnungsvorrichtung 40 und entsprechend auf das in Fig. 12 gezeigte mechanisch unterstützte Werkzeug 80. Der Anordnungsosten 42 ist mit einer vertikalen Bohrung bzw. einem Luftdurchlaß 43 durch denselben ausgebildet, der am Boden mit der Umgebungsluft kommuniziert. Eine interne durch einen Thermostaten gesteuerte Heizeinrichtung hält den Körper des Pfostens 42 nach dem Einschalten auf ungefähr 75°C, was wärmer als die Heißstarttemperatur von ungefähr 70°C ist. Diese Heizeinrichtung kann eine Widerstandsspule sein, die um die zentrale Bohrung 43 gewickelt oder einfach in der Grundplatte 45 oder im Pfosten 42 eingebettet ist. In der Bohrung 43 können Lamellen vorgesehen sein, um beim Erwärmen der durch den Luftdurchgang aufsteigenden Luft hilfreich zu sein. Durch Konvektion wird wie in einem Kamin eine aufsteigende Säule von Heißluft aufrechterhalten, die den Querträger 22 und den Deckel 16 umströmt, die vor der Endanordnung auf der Oberseite des Pfostens 42 angebracht sind. Der Querbalken 22 und die Klemmen 28 werden ebenfalls durch den Kontakt mit dem Anordnungspfosten 42 aus Metall erwärmt.

Die zu verarbeitenden Objekträger werden in einem erwärmten Träger aufbewahrt, der sie auf ungefähr 75°C hält. Die Klemmen 28, der Deckel 16 und der Querträger 22 können in kleinen erwärmten Behältern am Arbeitsplatz aufbewahrt und mit Pinzetten gehandhabt werden. Die zum Anbringen von zwei vorgewärmten Klemmen, einem Querträger und einem Deckel auf dem erwärmten Anordnungspfosten 42 erforderliche Zeitdauer beträgt typischerweise 10 bis 15 Sekunden. Die zum Übertragen des vorgewärmten Reagens 13 unter Verwendung einer vorgewärmten positiven Übertragungs-Pipettenspitze erforderliche Zeitdauer beträgt weniger als 10 Sekunden. Das erwärmte Reagens 13 wird nicht länger als weitere 10

Sekunden der Umgebung ausgesetzt, bevor der vorgewärmte Objekträger dichtend nach unten geschoben wird und die Komponenten der Halteanordnung 18 fest miteinander verbunden werden. Wenige Sekunden später kann die Objekträgeranordnung zurück in den erwärmten Träger gegeben werden, wobei sie sich nicht auf unter 70°C abgekühlt hat. Die durch Verdampfung verursachte Konzentration des Reagens sollte also minimal sein, da die Zeitdauer der Aussetzung an die Umgebungsbedingungen zu kurz ist.

Eine wirklicher physikalisch heißer Start kann erreicht werden, indem einfach das Anordnungswerkzeug erwärmt wird und die Objekträger, die Halteile, das Reagens und die Pipettenspitze am Arbeitsplatz in erwärmten Trägern aufbewahrt werden. Es sind keine weiteren Änderungen der Prozedur erforderlich. Die Prozedur wird durch die Verwendung des in Fig. 12 gezeigten Anordnungswerkzeugs vereinfacht, da hier das Aufbewahren der erwärmten Komponenten und der Kontakt mit den erwärmten Komponenten und der Führung 82 überflüssig gemacht wird. Es können auch zuvor verbundene Anordnungen von Klemmen 28 und Querträgern 22 für Heißstarts verwendet werden, wenn die Komponenten durch einen Klebstoff miteinander verbunden werden, der bei Umgebungstemperaturen hart ist, um die Verpackung und den Transport zu erleichtern, der aber bei heißen Starttemperaturen weich ist, um die Endanordnung zu erleichtern.

Thermische Wechselbehandlung der Anordnung

Die Klemmen 28 des Haltesystems 10 umgeben die Kanten des Objekträgers 14 und erstrecken sich über einige Millimeter der Rückseite 30 desselben. Deshalb muß die flache Wärmetauscherfläche einer zusammen mit dem neuen Haltesystem verwendeten Thermozykluseinrichtung mit Nuten versehen werden, die etwas weniger als 1 mm tief und 3 mm breit sind, um die Klemmen aufzunehmen.

Bestehende Thermozykluseinrichtungen wie die DNS-Thermozykluseinrichtungen von Perkin Elmer mit der Modellnummer 480 oder mit der Modellnummer 9600 können verwendet werden, um Objekträgeranordnungen in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung thermisch wechselzubehandeln, wenn eine Anpassungsplatte auf die flache obere Oberfläche des Thermozyklusblocks gelegt wird. Eine derartige Anpassungsplatte 110 ist in einer Draufsicht und in einer Schnittansicht jeweils in Fig. 14 und 15 gezeigt. Diese Platte 110 weist eine flache Bodenoberfläche 112 und eine obere Oberfläche 114 mit parallel beabstandeten Nuten 116 auf. Diese Nuten 116 sind derart dimensioniert, daß sie die Klemmen 28 aufnehmen, so daß der flache Oberflächenbereich 118 zwischen den Nuten 116 die

Glasoberfläche des auf der Anpassungsplatte plazierten Objektträgers 14 vollständig kontaktiert. Die Anpassungsplatte 110 kann dafür ausgebildet sein, bis zu drei oder vier Objektträgeranordnungen unterzubringen.

Eine wärmeleitende Flüssigkeit wie ein Öl oder ein wärmeleitendes Fett ist vorzugsweise über den oberen Oberflächenbereich 118 verteilt, um den Wärmekontakt über die Grenzfläche zwischen der Rückseite 30 des Objektträgers 14 und der flachen Wärmetauschoberfläche 118 zwischen den Nuten 116 zu erhöhen. Weiterhin sollte ein Silikonfett oder ein Mineralöl zwischen dem Thermozyklusblock und der Anpassungsplatte 110 verwendet werden, um einen sicheren Wärmekontakt über diese Grenzfläche sicherzustellen. Es können auch Ethylenglykol oder dessen Polymere vorteilhaft verwendet werden, um einen guten Wärmekontakt zwischen beiden Grenzflächen vorzusehen. Ethylenglykol oder dessen Polymere weisen den Vorteil auf, daß sie wasserlöslich sind, um das Reinigen der Anordnungskomponenten und des Thermozyklusblock zu vereinfachen. Ein anderer Vorteil bei der Verwendung von entweder Öl, Fett, Ethylenglykol oder dessen Polymeren zwischen den Objektträgern und der Anpassungsplatte und zwischen dem Thermozyklusblock und der Anpassungsplatte besteht darin, daß die Flüssigkeitsschicht als eine Saugklemme wirkt, um die Objektträger auf der Anpassungsplatte und die Anpassungsplatte auf dem Block in Position zu halten, so daß das Risiko eines Abrutschens während der Handhabung minimiert wird.

Experimente haben gezeigt, daß es erforderlich sein kann, die thermische Kalibrierung der DNS-Thermozykluseinrichtung neu einzustellen oder etwas höhere Temperaturen für in-situ-Amplifikationen vorzuschreiben, um Änderungen in der Wärmemasse des Gesamtsystems zu kompensieren. Zum Beispiel konnte eine geringer Temperaturabfall von bis zu 1°C vom Probenblock zur Oberseite der Objektträgeroberfläche festgestellt werden. Dieser Temperaturabfall wird wie oben erwähnt durch die Verwendung von Öl, Fett oder Ethylenglykol minimiert.

Eine in-situ-Version der DNS-Thermozykluseinrichtung

Das Haltesystem 10 der vorliegenden Erfindung kann für das Wechselbehandeln einer großen Anzahl von Objektträgern angepaßt werden, weil jede Anordnung 10 weniger als 4 mm dick ist, in jeder beliebigen physikalischen Position wechselbehandelt werden kann und kein Eintauchen in Öl erfordert. Zum Beispiel können die Anordnungen 10 vertikal in einem modifizierten Thermozyklusblock angeordnet werden, um eine größere Anzahl von Objektträgeranordnungen unterzubringen. Eine modifizierte Thermozykluseinrichtung 120 mit

inem modifizierten Metallblock 122 ist in Fig. 16 gezeigt. Der Block 122 umfaßt acht Schlitze 124, die mit Abständen von 10 mm und dazwischen jeweils Trennwänden 126 aus Metall angeordnet sind. Jeder Schlitz 124 ist ungefähr 5 mm breit und jede Trennwand 126 weist eine flache vertikale Wärmetauschoberfläche 128 mit dem erforderlichen Nutenpaar 130 zum Aufnehmen der Klemmen 28 auf der rechten Seite jeder Metalltrennwand 126 auf.

Fig. 17 ist eine Teilschnittansicht der Blocks 182 durch eine Objektträgeranordnung 10 die mit ihrer Kante in einem Schlitz 124 befestigt ist. Die Oberkante 132 der Bodennute 130 ist glatt abgeschrägt, um zu verhindern, daß die Klemme 28 an derselben hängen bleibt, wenn der Objektträger 14 in der vertikalen Richtung entfernt wird. Aus demselben Grund weist die obere Nute 130 keine Oberkante auf. Natürlich kann man sich bei einem derartigen Befestigen der Objektträger nicht darauf verlassen, daß die Schwerkraft den Objektträger 14 aus Glas verlässlich gegen die Wärmetauschoberfläche 128 aus Metall hält. Deshalb können kleine herkömmliche Blattfedern (nicht in den Zeichnungen gezeigt) an den Enden jedes Schlitzes 124 plaziert werden, um den Objektträger sanft aber sicher gegen die vertikale Metalloberfläche 128 zu halten. Wiederum sollte Mineralöl, Fett, Ethylenglykol oder eine andere wärmeleitende Flüssigkeit zwischen dem Objektträger 14 und der flachen Wärmetauschoberfläche 128 verwendet werden, um die Wärmeübertragung zu maximieren. Die Federn können nach dem Einsetzen der Objektträger in Kontakt gebracht werden und vor dem Entfernen derselben wieder herausgenommen werden oder aber permanent in den Schlitz 124 befestigt sein, um die Objektträgeranordnung 10 permanent in Kontakt mit der Oberfläche 128 zu drücken.

Wenn die thermische Wechselbehandlung abgeschlossen ist, werden die Objektträgeranordnungen 10 für die weitere Analyse aus den Schlitzen 124 entfernt. Die Teile des Haltesystems können leicht entfernt werden, indem die Klemmen 28 vom Objektträger 14 gezogen werden. Wenn die Halteteile und der Objektträger 14 in einen Behälter mit 5% Bleiche gegeben werden, um sie zu sterilisieren, und dann abgewaschen und getrocknet werden, dann können sie viele Male wiederverwendet werden. Die Wiederverwendung wird durch den Verschleiß des Deckels 16 und/oder des Randes 19 beschränkt, welcher sehr leicht durch eine visuelle Prüfung vor oder nach dem Klemmen des Deckels 16 auf einen Objektträger 14 festgestellt werden kann. Dabei ist zu beachten, daß eine Verunreinigung im Gegensatz zu einer auf einer Probe in Lösung durchgeführten PCR bei einer in-situ-PCR ein wesentlich geringeres Problem ist. Der Grund dafür liegt darin, daß die verunreinigende DNS nicht in die richtig fixierten Zellen gelangt. Weiterhin wird eine verunreinigende DNS mit den Reagenzien nach der thermischen Wechselbehandlung und vor den Entwicklungsschritten weg-

gewaschen. Diese Eigenschaft der in-situ-PCR macht waschbare und wiederverwendbare Teile annehmbarer als bei einer PCR in Lösung.

Reagens für die in-situ-PCR

Bei unserer Arbeit haben wir herausgefunden, daß die optimalen Quantitäten für die in-situ-PCR anders sind als für die PCR in Lösung. Erstens besteht das Problem des Verhältnisses zwischen Oberfläche und Volumen. Zehn Mikroliter eines Reagens in einem MicroAmp™-Glas weisen eine Oberfläche auf, die etwa 17mm² des Behälters berührt. Dasselbe Volumen eines Reagens zwischen einem Objektträger 14 und einem Deckel mit einem Durchmesser von 10 mm nimmt ungefähr 157mm² ein, d.h. die Oberfläche ist hier ungefähr neunmal größer. Deshalb wirken sich durch die Oberflächenbedingungen verursachte und gegenüber der PCR feindliche Effekte wie etwa die Absorption der Polymeraseenzyme bei der in-situ-PCR wesentlich stärker aus. Wenn die Oberflächen feindlicher sind als das sorgfältig ausgewählte Polypropylenmaterial der PCR-Reagenzgläser, dann werden die feindlichen Effekte sehr verstärkt und können die PCR leicht vollständig zunichte machen. Der weit verbreitete mit Silan behandelte Objektträger aus Glas weist zum Beispiel eine Oberfläche auf, die wesentlich feindlicher ist als Polypropylen.

Wir haben herausgefunden, daß es für die erfolgreiche Amplifikation von PCR in Lösung in Behältern in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung für die PCR-Reagenzien zusammen mit einem mit Silan behandelten Objektträger erforderlich ist, die für PCR in Lösung typische Menge der Taq-Polymerase in der Reaktion von 2,5 Einheiten pro 100 µl auf 12,5 Einheiten pro 100 µl zu erhöhen. Wir haben weiterhin herausgefunden, daß die PCR durch das Hinzufügen von 1 mg/ml von bovinem Serumweiß (BSA = Bovine Serum Albumen) zu dem Reagens vor der Oberfläche des Objektträgers geschützt werden kann. Wir glauben, daß BSA wirkt, indem es sofort wenigstens eine Monoschicht aus Eiweiß über der gesamten von ihm kontaktierte Oberfläche bildet. Die Monoschicht sieht dabei eine Oberfläche vor, auf der das Taq-Polymeraseenzym nicht fest haftet.

Wir haben bereits den Verlust von Wasser aus der Reaktion während der Wechselbehandlung erläutert. Bei aller Sorgfalt und rascher Arbeit geht etwas Wasser bei der Verwendung eines heißen Starts verloren. Etwas Feuchtigkeit geht auch durch Diffusion in oder sogar durch die dünnen Wände des flexiblen Deckels 16 aus Kautschuk oder Kunststoff verloren. In Anbetracht aller dieser zusätzlichen Verluste sollte die Formel eines PCR-Reagens für die in-situ-Amplifikation am verdünnten Ende des optimalen Konzentrationsbereichs für jede

Komponente sein, weil die einzige wahrscheinliche Änderung der Konzentrationen während des Einsetzens und Wechselbehandelns, wenn vorhanden, eine sehr kleine durch den Verlust an Wasser bedingte Erhöhung ist.

Das vollständige in-situ-PCR-System umfaßt also das Objektträger-Haltesystem 10, die Anordnungsvorrichtung 40 oder 80, eine modifizierte Thermozykluseinrichtung für einen oder mehrere Objektträger 14 mit den daran befestigten Halteanordnungen 10 sowie die wie oben erläutert modifizierten Reagenzien 13. Das neuartige und unerwartete Ergebnis dieser Kombination ist eine bequeme, robuste und genaue Feststellung der Position von bestimmten DNS-Abschnitten innerhalb von Zellen- und Gewebeproben.

Wenn die laterale Positionierung oder Beabstandung der Probe 12 zwischen den Kanten des Objektträgers konstant ist, kann der Ring 20 in den Querträger 22 integriert werden. Dies vereinfacht den Aufbau der Komponenten sowie das Anordnen der Halteanordnung 18 und des Haltesystems 10.

Der Aufbau der Haltesystems 10 kann auf verschiedene Weise vereinfacht werden. Zum Beispiel können der Querträger und der Halterung integriert sein. Eine alternative Ausführungsform des Querträgers und des Deckels in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung ist in Fig. 18 dargestellt. Eine Variation dieses alternativen Querträgers ist in Fig. 19 dargestellt. In der folgenden Beschreibung werden gleiche Bezugszeichen verwendet, um identische oder austauschbare Komponenten des oben beschriebenen in-situ-PCR-Haltesystems anzugeben.

Im folgenden wird auf Fig. 18 und 19 Bezug genommen, die Draufsichten auf jeweils mit einem alternativen Deckel verbundene alternative Querträger 120 und 140 sind. Der Unterschied zwischen den Querträgern 120 und 140 besteht einfach in der Anordnung der kreisförmigen Öffnung 124 bzw. 142. Die Öffnung 124 im Querträger 120 ist zentral angeordnet. Im Gegensatz dazu ist die Öffnung 142 im Querträger 140 neben einem Ende 144 des Querträgers 140 angeordnet. Die beiden Querträger 120 und 140 erlauben das Anordnen des Deckels 122 über einer Probe 12, die irgendwo auf einem Objektträger 14 angebracht ist, indem einfach die Ausrichtung des Querträgers 140 geändert wird oder indem der Querträger 120 gewählt wird, der eine zentral angeordnete Öffnung 124 aufweist. In diesen Ausführungsformen ist der Dichtungsring einstückig mit dem Querträger ausgebildet. Der Querträger 120 weist einen im wesentlichen kreisförmigen Ringteil 126 auf, der auf einen Randteil

128 des Deckels 122 drückt, wenn das Behältersystem 10 wie in den Teilschnittansichten 20 und 21 gezeigt angeordnet wird.

Der Querträger 120 ist vorzugsweise ein gestanztes Stück Blech aus nichtrostendem Stahl. Der Querträger 120 weist ein Paar von parallelen, vertikal gebogenen Kanten auf, die Schienen 130 bilden, die sich zwischen gegenüberliegenden Enden 132 erstrecken, welche mit einem flachen Winkel von ungefähr 3° nach unten gebogen sind, um die Klemmen 134 in ähnlicher Weise wie die Klemmen 28 in der oben beschriebenen ersten Ausführungsform aufzunehmen. Wie in Fig. 21 gezeigt, drückt jede Klemme 134 während des Einsetzens auf das Ende 132 und den Objekträger 14, um den Randteil 128 des Deckels 122 auf dem Objekträger 14 zusammenzudrücken.

Ein besonderes Merkmal dieser alternativen Ausführungsform der Anordnung des Querträgers 120 und des Deckels 122 besteht darin, daß der Deckel 122 eine ringförmige Rippe bzw. einen ringförmigen Grat 136 zwischen dem Randteil 128 und dem zentralen nach oben gewölbten oder konkaven Teil 138 mit der darunter enthaltenen Reagenzmischung 13 aufweist. Dieser ringförmige Grat 136 weist vorzugsweise einen vergrößerten birnenförmigen Oberteil 137 auf, der in die Öffnung 124 einschnappen kann, um die Teile zusammenzuhalten. Der Deckel 122 und der Querträger 120 können als separate Einheit miteinander verbunden werden, um die in Fig. 21 gezeigte Endanordnung der Komponenten des Haltesystems 10 dieser alternativen Ausführungsform zu vereinfachen.

Der Querträger 120 kann ausgeschnittene Bereiche 139 aufweisen, um unnötiges Metallmaterial zu sparen. Alternativ dazu können die ausgeschnittenen Bereiche 139 durch Rippen oder Wellen (nicht gezeigt) ersetzt werden um die Starrheit des Querträgers 120 zu erhöhen.

Wie in Fig. 19 gezeigt, weist der Querträger 140 parallele erhobene Schienenkanten 146 und im Gegensatz zu den zwei ausgeschnittenen Bereichen im Querträger 120 einen einzigen ausgeschnittenen Bereich 148 auf. Der Querträger 140 kann um 180° aus der in Fig. 19 gezeigten Position gedreht werden, um derart auf dem Objekträger 14 plaziert zu werden, daß durch die Querträger 120 und 140 praktisch alle möglichen Probepositionen auf einem Objekträger 14 unterstützt werden.

Das Anordnen des in Fig. 18-21 gezeigten alternativen Haltesystems 10 ist ähnlich wie oben mit Bezug auf die erste Ausführungsform beschrieben, wobei jedoch kein Halterung 20 erfor-

derlich ist und der Deckel 122 und der Querträger 120 zuerst miteinander verbunden werden. Die manuellen oder mechanisch unterstützten Anordnungswerkzeuge 40 und 80 können wie zuvor beschrieben verwendet werden, um das Haltesystem auf den Objektträgern anzuordnen und heiße Starts durchzuführen.

Fig. 22 bis 24 zeigen eine dritte Ausführungsform des Haltesystems 10 in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung, die einen weiteren alternativen Deckel und Querträger 150 verwendet. Der in einer Draufsicht in Fig. 22 gezeigte Querträger 150 dieser Ausführungsform ist wiederum ein gestanztes Stück Metallblech mit parallelen erhobenen Schienen 152 und gebogenen Enden 154. Diese Ausführungsform weist jedoch keine zentrale Öffnung auf, durch die sich der zentrale Teil des Deckels 156 erstreckt. Statt dessen erfüllt eine ringförmige Mulde oder Vertiefung 158 die Funktion des Halterings 20 der ersten Ausführungsform und des Ringteils 126 der zweiten Ausführungsform. Diese ringförmige Mulde 158 ist derart dimensioniert, daß der Ringteil 160 des Deckels 156 vollständig die Unterseite der Mulde 158 kontaktiert. Wie bei dem Deckel der zweiten Ausführungsform steht ein erhöhter Grat 162 zwischen dem Randteil 160 und einem zentralen Teil 164 des Deckels 156 nach oben vor. Der Deckel 156 kann optional einen zentralen Vorsprung bzw. einen Knopf 166 aufweisen, der dafür ausgebildet ist, in eine zentral an der Innenseite der ringförmigen Mulde ausgebildete Öffnung 168 einzuschnappen, um den Deckel 156 und den Querträger 150 zusammenzuhalten. Wenn dieser zentrale Vorsprung 166 wie gezeigt vorgesehen ist, ist es nicht erforderlich, den Grat 162 auf dem Deckel 156 vorzusehen. Außerdem ist es nicht erforderlich, den Deckel 156 mit einem konkaven zentralen Teil 164 auszubilden. Das Einschnappen des Vorsprungs 166 in die Öffnung 168 zieht den zentralen Teil nach oben gegen den zentralen Teil des Querträgers 150, um die erforderliche Krümmung zum Aufnehmen des Reagens 13 vorzusehen. Obwohl der Grat 162 in diesem Fall nicht erforderlich ist, kann der Grat 162 dabei hilfreich sein, diese zentrale Krümmung zu definieren.

Der Querträger 150 kann wie in Fig. 22 gezeigt auch eine Vielzahl von Wellen oder Rippen 170 aufweisen, die in das Metallblechmaterial gepreßt sind, um die Starrheit der Struktur zu erhöhen, so daß es aus einem sehr dünnen Metallblechmaterial hergestellt werden kann, um die thermische Masse und die Gesamtdicke zu reduzieren.

Diese alternative Ausführungsform 130 weist einen besonderen Vorteil gegenüber den zuvor beschriebenen Ausführungsformen auf. Da der Querträger 150 den flexiblen Deckel 156 vollständig bedeckt, ist es nicht erforderlich, daß das Material des Deckels in demselben Maß undurchlässig für die Diffusion von Feuchtigkeit oder nicht feindlich gegenüber der

PCR-Reaktion ist. Dementsprechend ist eine größere Auswahl an Materialien verfügbar. Eine Zusammensetzung oder Schichtung aus Silikonkautschuk mit einem undurchlässigen Elastomer wie Polypropylen ist nicht erforderlich. Der Grund dafür ist, daß die Diffusion von Feuchtigkeit durch den zentralen Teil 164 des Deckels 156 in den geschlossenen Raum 172 rasch ein Gleichgewicht erreicht, da das Volumen sehr klein ist. Die Verdunstung kann weiter minimiert werden, indem wie gezeigt der optionale Vorsprung 166 und die optionale Öffnung 168 beseitigt werden. Wenn der zentrale Knopf 166 beseitigt wird, dann kann der erhobene Grat 162 verwendet werden, um den Deckel 156 in Position und unter demselben Querträger 150 zu halten.

Der leere Bereich 172 ist jedoch erforderlich, um das Verschieben des Deckels 156 beim Zusammendrücken des Randteils 160 während des Anbringens der Klemmen 28 oder 134 zu erlauben, um eine Dichtung herzustellen, die das Reagens 13 effektiv auf der Probe 12 hält. Das umschlossene Volumen 172 dient auch dazu, den Druck unter dem Deckel 156 während der thermischen Wechselbehandlung zu kontrollieren. Dadurch wird eine Blasenbildung im Reagens 13 während der Inkubationen bei der Denaturierungstemperatur nahe 95°C reduziert oder verhindert.

Die Ausbildung der Schienen 152 ist am besten in der Teilschnittansicht von Fig. 24 gezeigt. Diese parallelen Schienen 152 sind im wesentlichen umgebogene Kanten des Metallblechstücks des Querträgers 150. Dieser Aufbau ist relativ starr und erlaubt die Verwendung eines Blechmaterials mit minimaler Dicke. Außerdem minimieren die umgebogenen Kanten das Vorhandensein von scharfen Kanten, die die Handhabung von dünnen Metallmaterialien gefährlich machen. Aus demselben Grund können auch die Enden 154 in derselben Weise wie die Schienen 152 umgebogen sein.

Der Querträger 150 kann eine zentral angeordnete ringförmige Mulde 159 aufweisen, um zentral angeordnete Proben auf dem Querträger 14 zu halten. Diese Alternative ist nicht gezeigt, da sie eine offensichtliche Variation der in Fig. 22 gezeigten ist.

Die vorstehende Beschreibung stellt bevorzugte Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung dar, wobei zu beachten ist, daß das Konzept eines in-situ-PCR-Haltesystems in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung in anderer Form als hier beschrieben realisiert werden kann. Zum Beispiel können die Querträger und Spitzen aus einem starren Kunststoffmaterial hergestellt sein, oder eine der Klemmen 28 kann einstückig mit einem Ende des

08.02.99

Querträgers 22 ausgebildet sein, so daß nur eine separate Klemme 28 für das gegenüberliegende Ende 26 des Querträgers 22 benötigt wird.

06-02-99

EP 93 115 813.3

THE PERKIN-ELMER CORPORATION

Patentansprüche

1. Eine Halteeinrichtung (18), die zur in-situ-PCR Amplifikation zweckmäßig ist, um ein Fluid an einem Objektträger (14) zu halten, wobei die Einrichtung umfaßt:
 - ein flexibles Deckteil (16);
 - ein ringförmiges Kompressionsteil (20); und
 - zumindest eine Klemmeneinrichtung (28), um das genannte Deckteil und das genannte ringförmige Kompressionsteil an dem genannten Objektträger zu halten, so daß das genannte ringförmige Kompressionsteil das genannte flexible Deckteil zumindest über einen Abschnitt vom ihm gegen den genannten Objektträger drückt, um dadurch eine Dichtung zu erhalten.
2. Die Einrichtung gemäß Anspruch 1, wobei das genannte Deckteil (16) elastisch und verformbar konkav ist.
3. Die Einrichtung gemäß Anspruch 2, wobei die konkave Abdeckungsform ein vorbestimmtes Volumen begrenzt, um eine bestimmte Menge eines Reagenz (13) zu halten.
4. Die Einrichtung gemäß Anspruch 3, wobei das genannte Deckteil (16) aus einem Gummifolienmaterial hergestellt ist.
5. Die Einrichtung gemäß Anspruch 1, wobei das genannte Deckteil (16) an dem genannten Kompressionsteil (20) befestigt ist.

6. Die Einrichtung gemäß Anspruch 5, wobei das genannte Deckteil (16) eine Scheibe aus Gummifolienmaterial ist und das Kompressionsteil (20) ein starrer Ring ist, der mit dem Randabschnitt (19) der genannten Scheibe verbunden ist.
7. Die Einrichtung gemäß Anspruch 6, wobei der genannte starre Ring ein rostfreier Stahlring ist.
8. Die Einrichtung gemäß Anspruch 6, wobei der genannte starre Ring einen flachen Basisabschnitt aufweist, der mit dem genannten Randabschnitt (19) des genannten Deckteils (16) verbunden ist.
9. Die Einrichtung gemäß Anspruch 8, die des weiteren ein Querträgerteil (22) umfaßt, das zwischen die genannte Klemmeneinrichtung (28) und den genannten Objekträger (14) über zumindest einen Abschnitt des genannten Rings (20) paßt.
10. Die Einrichtung gemäß Anspruch 1, wobei die genannte Klemmeneinrichtung (28) eine allgemein U-förmige Metallklemme ist, die ein Paar gegenüberstehender, beabstandeter Seiten in der Größe aufweist, daß sie das genannte Deckteil (16) an die genannte Platte klemmen.
11. Die Einrichtung gemäß Anspruch 9, wobei die genannte Klemmeneinrichtung (28) ein Paar allgemein U-förmiger Klemmen ist, von denen jedes ein Paar gegenüberstehender, beabstandeter Seiten in der Größe aufweist, um ein Ende des genannten Querträgerteils (22) und einen Randabschnitt des genannten Trägers (14) dazwischen einzuklemmen.
12. Die Einrichtung gemäß Anspruch 11, wobei das genannte Querträgerteil (22) ein Paar beabstandeter Schienen (24) zum Eingriff an beabstandeten Abschnitten des genannten Rings (20) und gegenüberstehende, flache Enden (26) aufweist, die die genannten Schienen zum Eingriff mit den genannten Klemmen verbinden.
13. Die Einrichtung gemäß Anspruch 12, wobei jedes der genannten Enden (26) gebogen ist, um eine geneigte Ebene zu bilden.

14. Die Einrichtung gemäß Anspruch 1, wobei das genannte Deckteil (16) eine un-durchlässige Schicht und eine Schicht einschließt, die gegenüber Polymerase-Kettenreaktions-Reagenzien inert ist.
15. Eine Halteeinrichtung gemäß Anspruch 1, wobei das genannte Deckteil (122) ei-ne ringförmigen Rippe (136) zwischen dem genannten Abschnitt des genannten Deckteils und einem mittigen Bereich des genannten Deckteils aufweist.
16. Die Einrichtung gemäß Anspruch 15, die des weiteren ein Querträgerteil (140) einschließt, das einen mittigen Abschnitt mit einer hindurchgehenden Öffnung (124, 142) aufweist, die die genannte ringförmige Rippe aufnehmen kann, um das genannte Querträgerteil (22) und das genannte Deckteil (16) lösbar zusam-menzuhalten.
17. Die Einrichtung gemäß Anspruch 16, wobei das genannte Querträgerteil ein Paar allgemein paralleler Schienen (130; 146) mit dem genannten mittigen Abschnitt dazwischen aufweist.
18. Die Einrichtung gemäß Anspruch 17, wobei das genannte Kompressionsteil ei-nen allgemein flachen, ringförmigen Abschnitt um die genannte Öffnung herum und zwischen den genannten Schienen umfaßt.
19. Die Einrichtung gemäß Anspruch 18, wobei das genannte Querträgerteil aus Me-tallblech hergestellt ist.
20. Die Einrichtung gemäß Anspruch 18, wobei der genannte mittige Abschnitt des genannten Querträgerteils allgemein flach ist.
21. Die Einrichtung gemäß Anspruch 18, wobei der genannte flache, ringförmige Ab-schnitt um die genannte Öffnung herum Teil einer ringförmigen Wanne in dem genannten mittigen Abschnitt des genannten Querträgerteils ist.

22. Ein System zur in-situ-PCR Amplifikation einer Nucleinsäuresequenz, die in einer Probe enthalten ist, auf die eine Reagenzmischung angewendet wird, wobei eine Halteeinrichtung für die genannte Probe gemäß Anspruch 1 verwendet wird und das System des weiteren umfaßt:

eine Thermozykluseinrichtung (120) mit einem temperaturgesteuerten Block (122), der den genannten Objekträger (14) aufnehmen und gegen einen Abschnitt des genannten Blocks halten kann, so daß die Temperatur der genannten Probe auf dem genannten Träger der Temperatur des genannten temperaturgesteuerten Blocks folgt.

23. Das System gemäß Anspruch 1, wobei das genannte Deckteil (16) eine Form hat, die elastisch und verformbar konkav ist.

24. Das System gemäß Anspruch 23, wobei die genannte konkave Abdeckungsform (16) ein vorbestimmtes, spezifisches Volumen in der genannten Auswölbung begrenzt, um die genannte Reagenzmischung (13) zu halten.

25. Das System gemäß Anspruch 24, wobei das genannte Deckteil (16) aus einer Gummifolie hergestellt ist.

26. Das System gemäß Anspruch 22, wobei das genannte Kompressionsteil (20) einen starren ringförmigen Dichtungsring umfaßt, der an einem Randabschnitt (19) des genannten Deckteils (16) befestigt ist.

27. Das System gemäß Anspruch 26, wobei der genannte Randabschnitt (19) mit dem genannten Ring verbunden ist.

28. Das System gemäß Anspruch 27, wobei der genannte Ring (20) einen flachen Basisabschnitt aufweist, der mit dem genannten Randabschnitt (19) verbunden ist.

29. Das System gemäß Anspruch 22, das des weiteren ein Querträgerteil (22) umfaßt, das gegenüberstehende Enden aufweist, die zwischen die genannte Klem-

meneinrichtung (28) und den genannten Objektträger (14) passen, wobei sich das Querträgerteil über einen Abschnitt des genannten Kompressionsteils erstreckt.

30. Das System gemäß Anspruch 22, wobei die genannte Klemmeneinrichtung (28) eine allgemein U-förmige Metallklemme ist, die ein Paar gegenüberstehender, beabstandeter Seiten in der Größe aufweist, daß sie das genannte Deckteil (16) an den genannten Träger klemmen.
31. Das System gemäß Anspruch 29, wobei die genannte Klemmeneinrichtung (28) ein Paar allgemein U-förmiger Klemmen ist, von denen jedes ein Paar gegenüberstehender, beabstandeter Seiten in der Größe aufweist, um eines der genannten Enden des genannten Querträgerteils (22) an einen Randabschnitt des genannten Trägers zu klemmen.
32. Das System gemäß Anspruch 11, wobei das genannte Querträgerteil (22) ein Paar beabstandeter allgemein paralleler Schienen (24) aufweist, die an gegenüberstehenden Enden zum Eingriff an beabstandeten Abschnitten des genannten Kompressionsteils angrenzen.
33. Das System gemäß Anspruch 32, wobei jedes der genannten Enden (26) gebogen ist, um eine geneigte Ebene zu bilden, um an der genannten Klemme so einzugreifen, daß das genannte Querträgerteil fortschreitend das genannte Kompressionsteil, das unter dem genannten Querträgerteil montiert ist, gegen den genannten Träger drückt, wenn das genannte Klemmenpaar über den genannten Enden der genannten Randabschnitte des genannten Trägers eingerichtet wird.
34. Das System gemäß Anspruch 31, wobei der genannte Block (122) ein Metallkörper ist, der eine Mehrzahl vertikale Schlitze aufweist, von denen jeder zumindest einen der genannten Träger, Abdeckung und Halteeinrichtung aufnimmt, wobei die genannten Schlitze Teilungswände dazwischen bilden, jede Teilungswand eine flache Wärmeaustauschoberfläche und ein Paar beabstandeter, horizontaler Nuten in der genannten Oberfläche zur Aufnahme der genannten Klemmen auf-

weist, so daß eine Seite des genannten Trägers in dem genannten Schlitz gegen die genannte Wärmeaustauschoberfläche angeordnet werden kann.

35. Das System gemäß Anspruch 23, das des weiteren eine allgemeine flache Anpassungsplatte (110) umfaßt, die entfernbar an dem genannten Block zum Halten von zumindest einem der genannten Träger während des Thermozyklus lösbar befestigt ist.
36. Das System gemäß Anspruch 35, wobei die genannte Anpassungsplatte (110) eine Mehrzahl Nuten (116) in einer Oberfläche aufweist.
37. Das System gemäß Anspruch 35, wobei die genannte Anpassungsplatte (110) eine glatte Unterfläche (112) zur Anpassung an den genannten Block aufweist und eine obere Oberfläche mit zumindest einem allgemein flachen Trägeraufnahmeabschnitt (118) aufweist.
38. Das System gemäß Anspruch 37, wobei der genannte Trägeraufnahmeabschnitt (118) zumindest ein Paar Ausnehmungen zur Aufnahme des genannten Klemmenpaares aufweist, das an den Rändern des genannten Trägers montiert ist.
39. Das System gemäß Anspruch 37, wobei die genannte Platte (110) ein allgemein flacher Metallkörper ist.
40. Das System gemäß Anspruch 39, wobei die genannte Platte (110) aus Aluminium hergestellt ist.
41. Das System gemäß Anspruch 38, wobei die genannten Ausnehmungen (116) Nuten mit allgemein flachem Boden sind.
42. Eine Vorrichtung (80) zum Zusammenbau einer in-situ-PCR Probe und einer Halteinrichtung gemäß Anspruch 1, wobei die genannte Vorrichtung umfaßt:
eine Grundplatte (45);

einen an der genannten Grundplatte (45) angebrachten Haltepfosten (42), wobei der genannte Haltepfosten eine allgemein horizontale, obere Oberfläche zur Aufnahme und zum Halten von Komponenten der genannten Halteeinrichtung in einer vorbestimmten beabstandeten Beziehung aufweist; und

eine vertikal bewegbare Objektträgerhalteplatte (44, 82), die zwischen einer Position oberhalb der genannten oberen Oberfläche des genannten Pfostens und einer Position bewegbar ist, in der Abschnitte der genannten Platten der genannten oberen Oberfläche des genannten Pfosten nahe sind.

43. Die Vorrichtung gemäß Anspruch 42, die des weiteren umfaßt eine Heizeinrichtung, die mit dem genannten Pfosten (42) gekoppelt ist, um das genannte Deckteil (16) und das genannte Reagenzfluid, das daran angebracht ist, vor dem Zusammenbau des genannten Deckteils (16) und der Halteeinrichtung an dem genannten Objektträger zu erwärmen.
44. Die Vorrichtung gemäß Anspruch 43, wobei die genannte Heizeinrichtung eine Bohrung durch den genannten Pfosten (42) hindurch einschließt, um den Durchgang erwärmer Luft von der genannten Heizeinrichtung dort hindurch aufwärts zu lenken, um das genannte Deckteil (16) und das genannte Reagenzfluid zu erwärmen.
45. Die Vorrichtung gemäß Anspruch 44, wobei der genannte Pfosten eine Mehrzahl Lamellen aufweist, die nach innen in die Bohrung hervorstehen, um den Wärmeübergang zwischen dem genannten Pfosten und der genannten durch die genannte Bohrung hindurchgehenden Luft zu verstärken.
46. Die Vorrichtung gemäß Anspruch 42, die des weiteren umfaßt:

einen länglichen Kompressionsarm (84), der von der genannten Grundplatte an einer von dem genannten Pfosten (42) beabstandeten Position bewegbar gehalten ist, wobei der genannte Arm betätigbar ist, an einem Objektträger einzugreifen, der in der genannten Halteplatte angeordnet ist, und die genannte Platte und

den Träger abzusenken, bis der genannte Träger an der genannten Halteinrichtung eingreift; und

einen federbelasteten Halteinrichtungs-Einbaumechanismus, der verschwenkbar an dem genannten Pfosten angebracht ist, wobei der genannte Mechanismus ein Zangenpaar (100) mit Fingerabschnitten (102) aufweist, die nahe und oberhalb gegenüberstehender Ränder der genannten horizontalen, oberen Oberfläche des genannten Pfosten angeordnet sind, und betätigbar ist, die genannten Fingerabschnitte in Richtung zueinander zu bewegen.

47. Die Vorrichtung gemäß Anspruch 46, wobei der genannte Einbaumechanismus des weiteren umfaßt, daß jede der genannten Zangen (100) einen Griffabschnitt (104) aufweist, der sich von jedem der genannten Fingerabschnitte erstreckt, wobei jede der genannten Zangen verschwenkbar an dem genannten Pfosten angebracht ist.
48. Die Vorrichtung gemäß Anspruch 47, wobei die genannten Griffabschnitte jeweils um zumindest einen Abschnitt zweier Seiten des genannten Pfostens herumgeführt sind.
49. Die Vorrichtung gemäß Anspruch 48, wobei der genannte Kompressionsarm (84) eine hindurchgehende Öffnung aufweist, die über dem genannten Haltepfosten ausgerichtet ist.
50. Die Vorrichtung gemäß Anspruch 49, wobei der genannte Arm ein Dämpfungs-kissen (98) um die genannte Öffnung herum zur Berührung des genannten Glas-trägers aufweist.

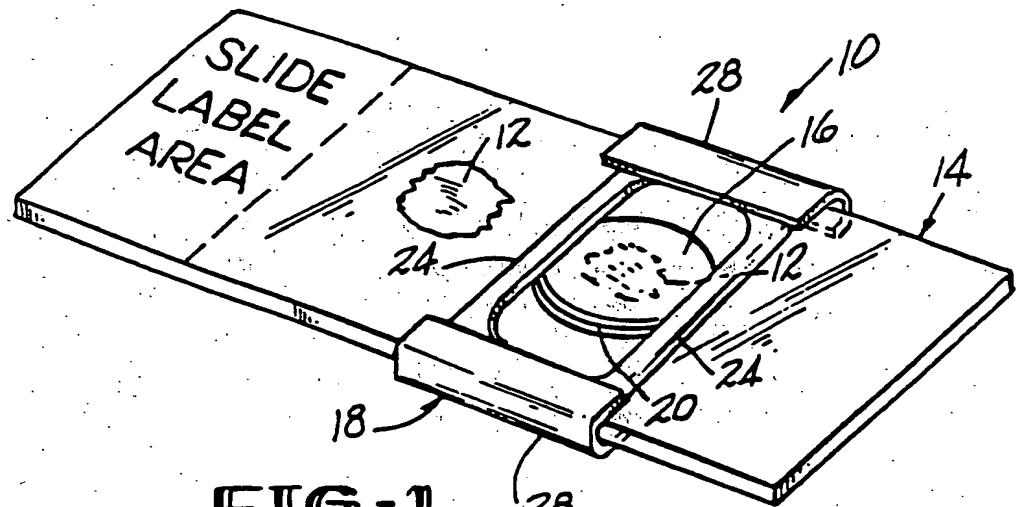


FIG-1

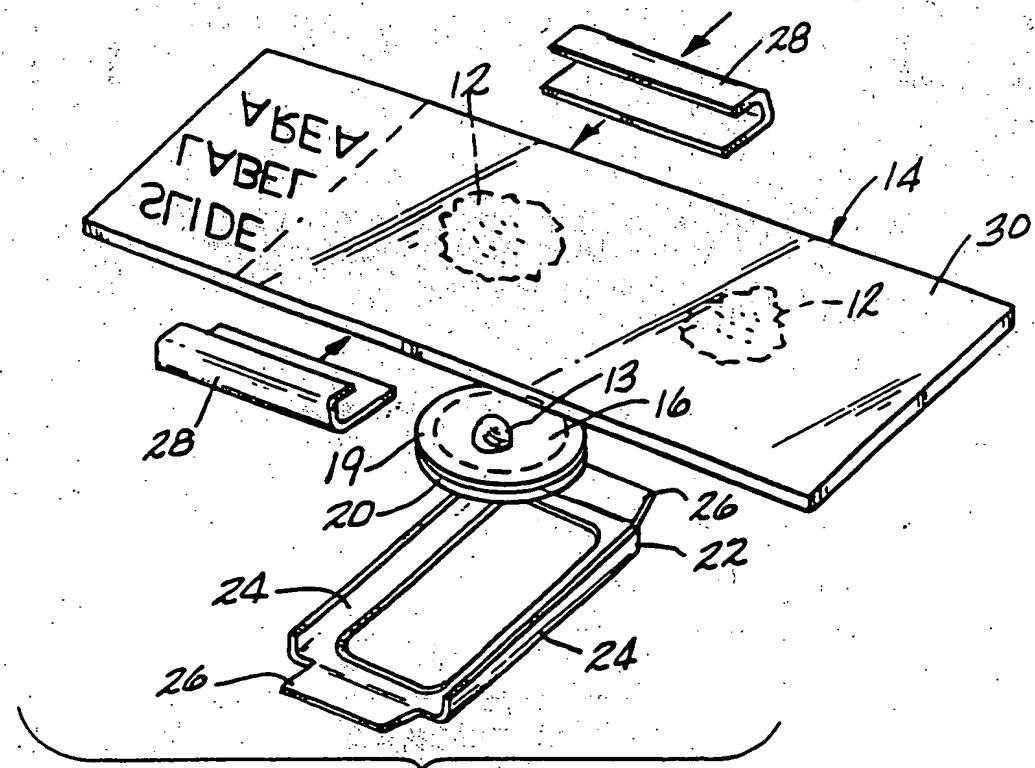


FIG-2

218 06.02.99

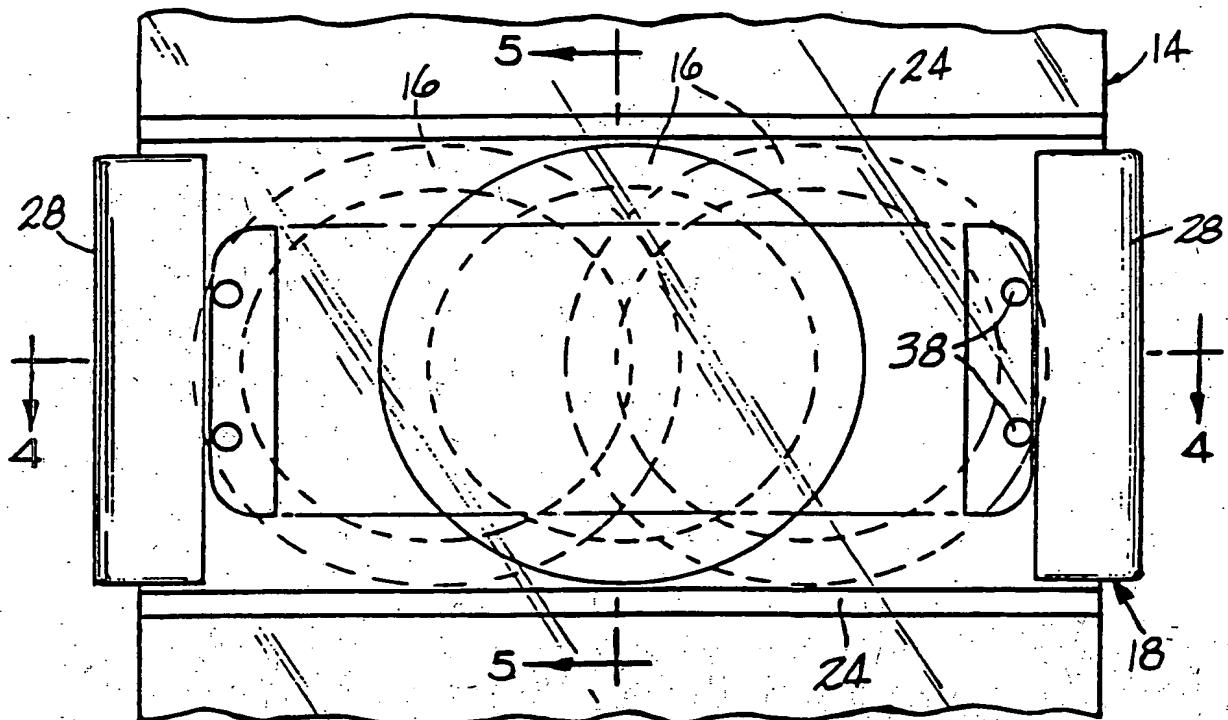


FIG-3

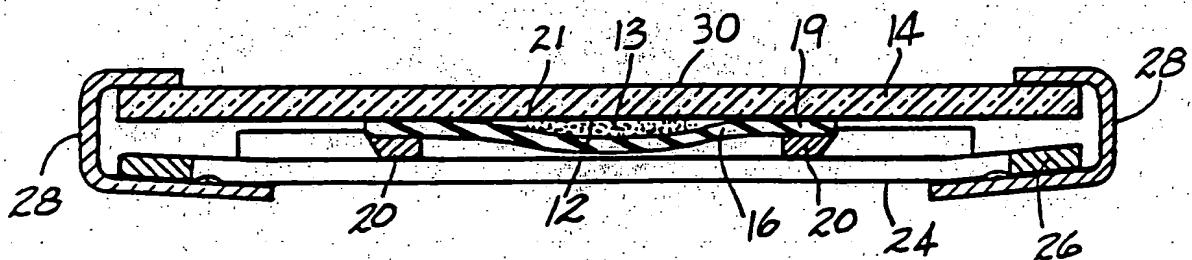


FIG-4

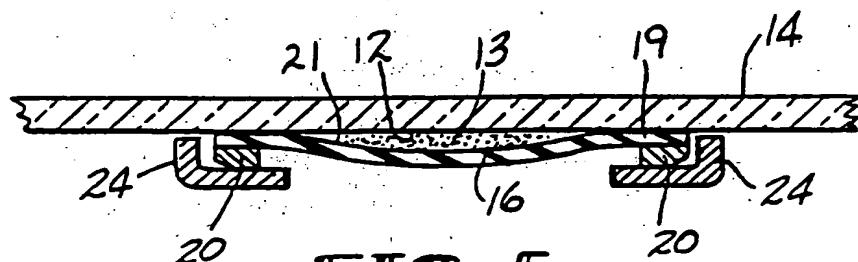


FIG-5

38 08-02-98

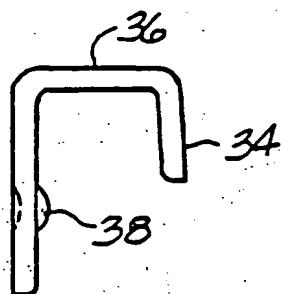


FIG-6

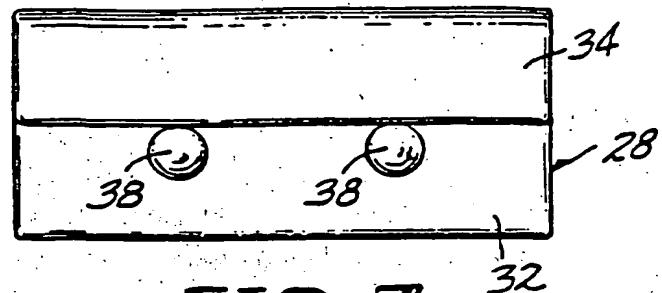


FIG-7

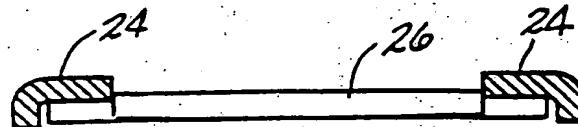


FIG-10

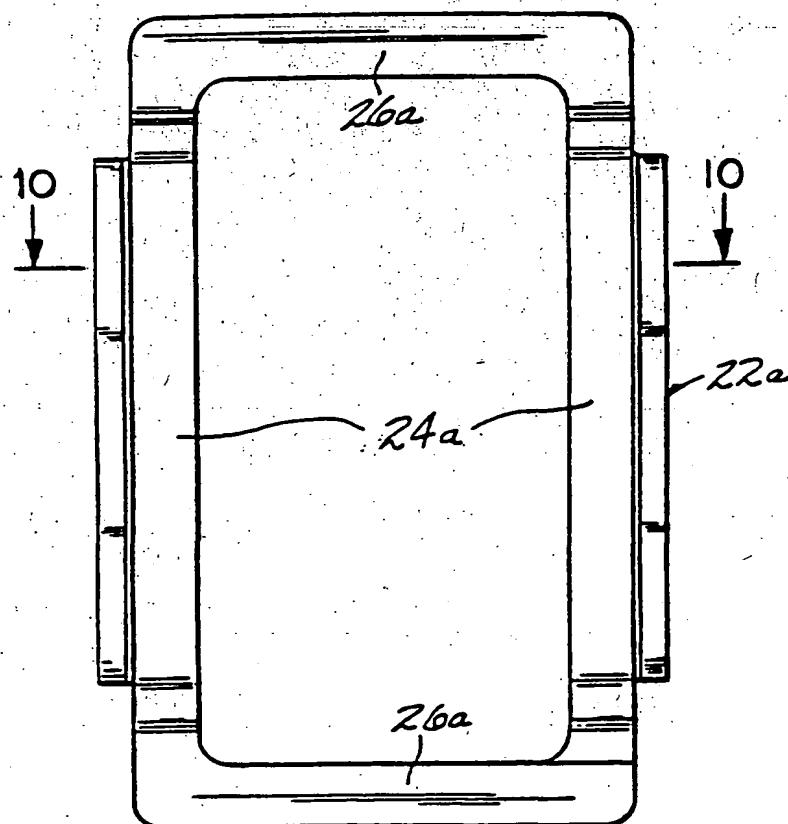


FIG-8

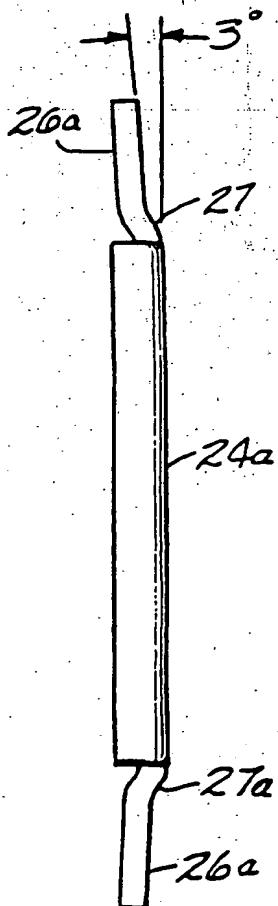


FIG-9

418 08-002-99

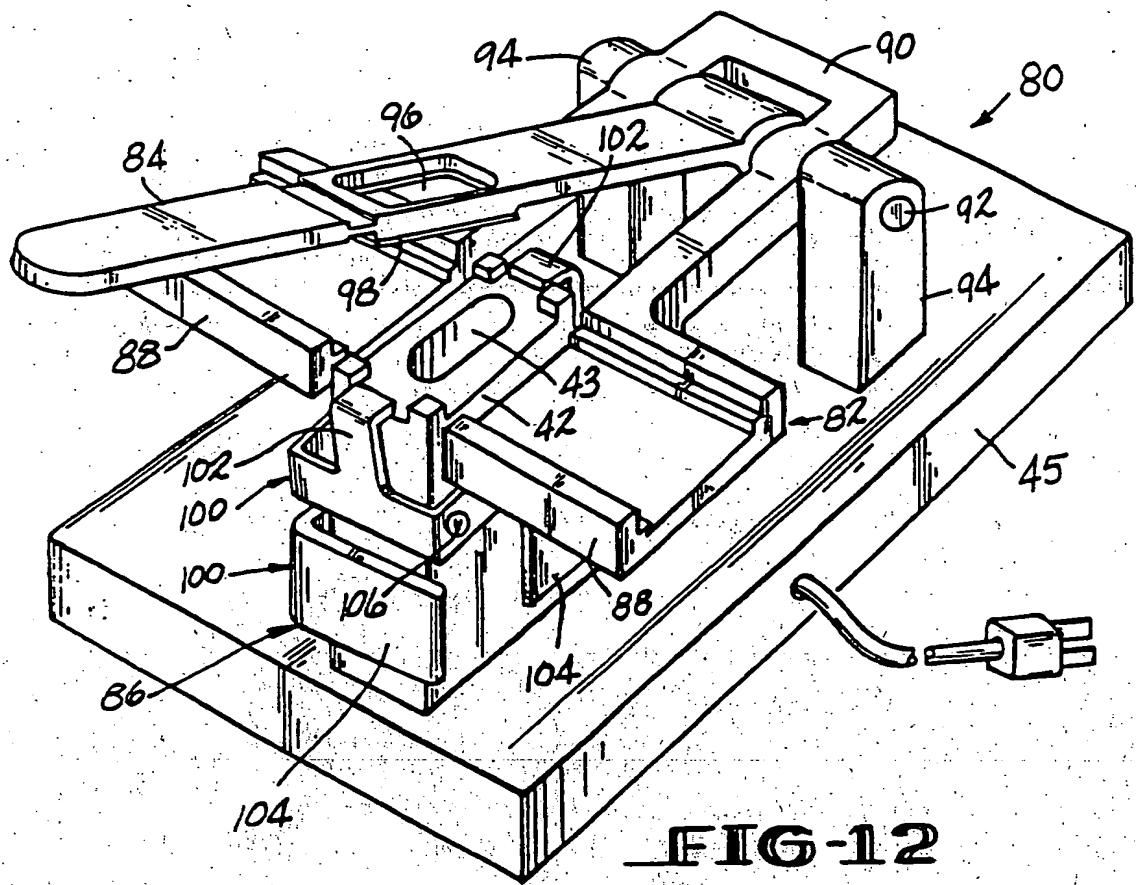


FIG-12

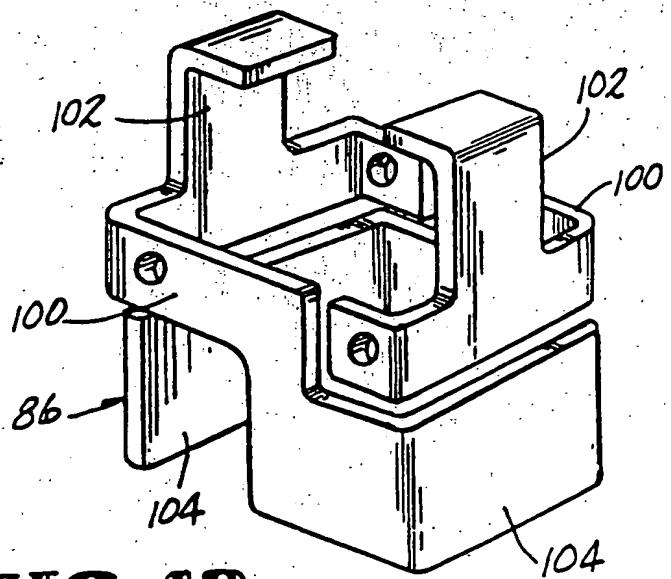


FIG-13

518 06-02-99

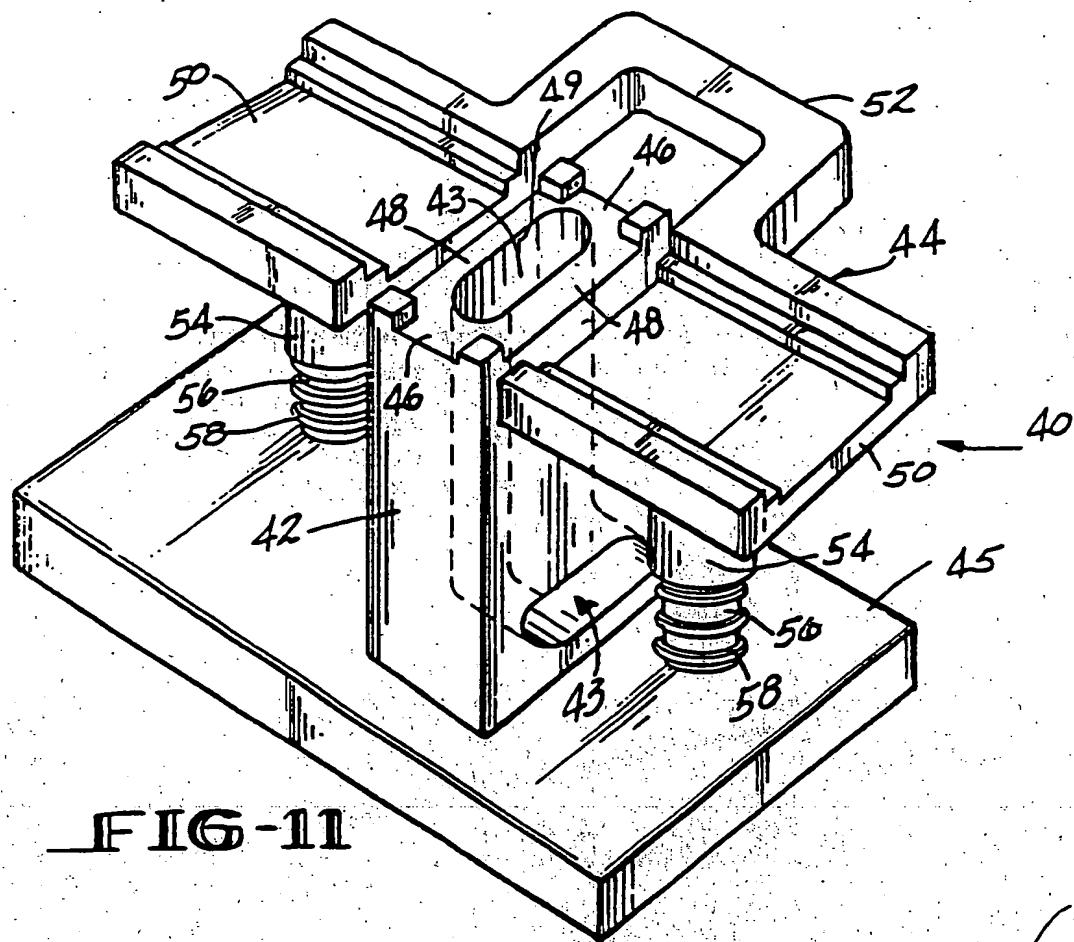


FIG-11

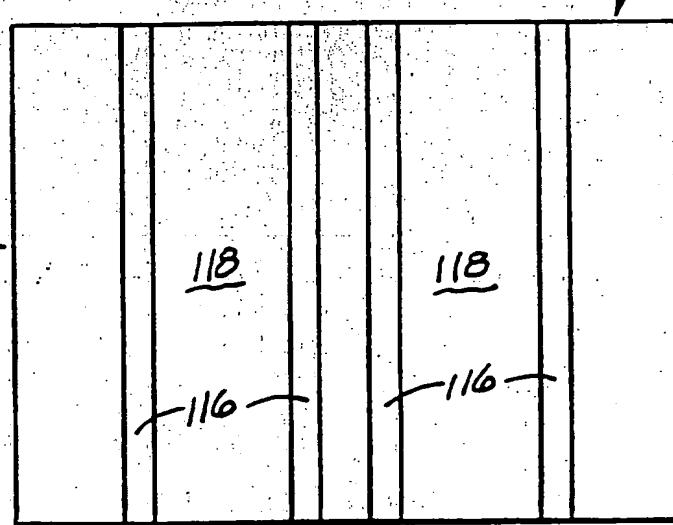


FIG-14

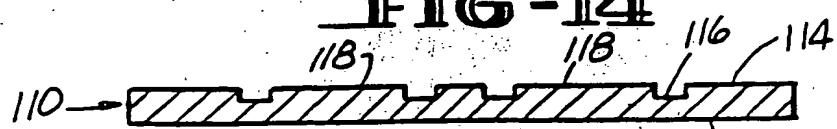
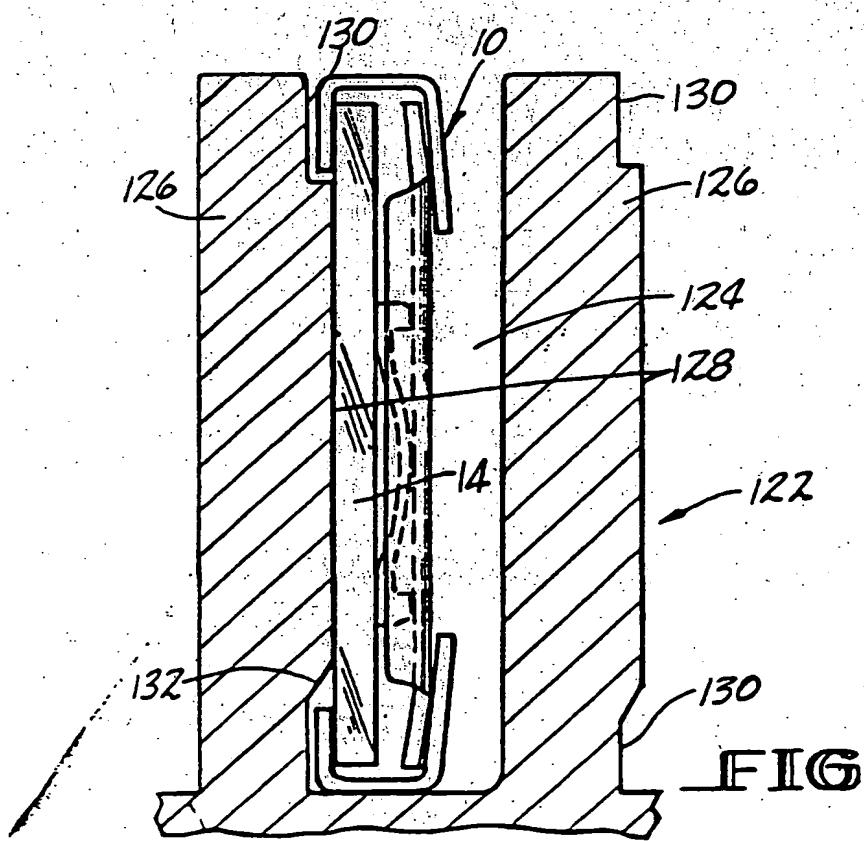
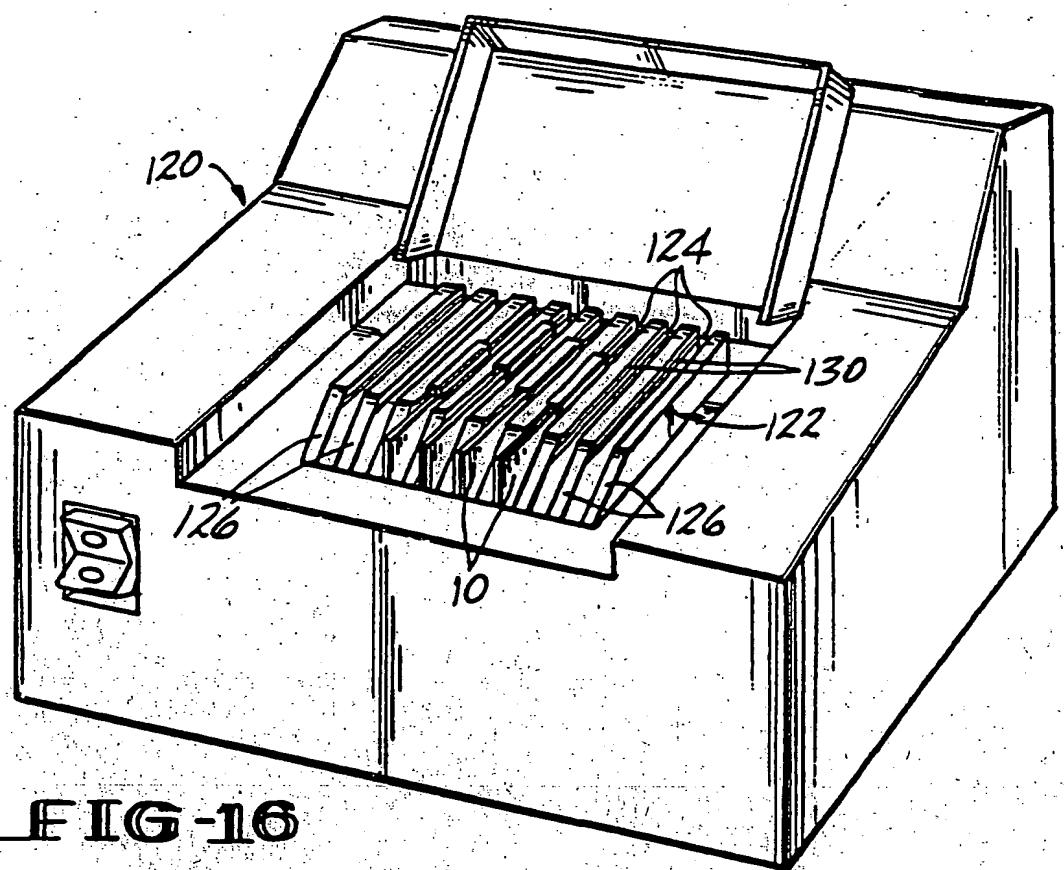


FIG-15

618 08-02-99



00.000.00

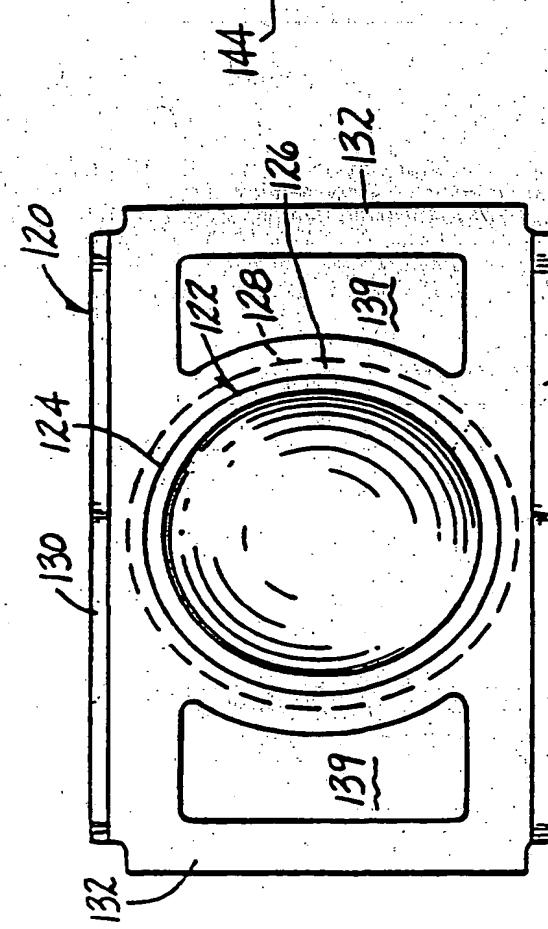
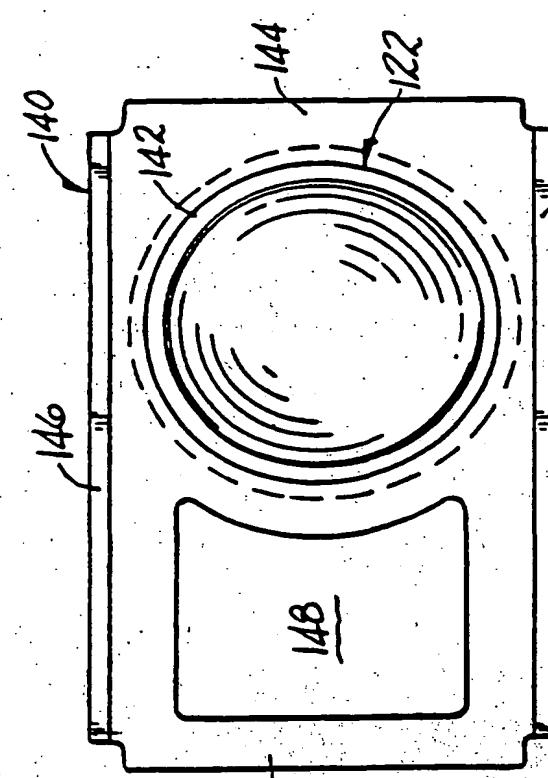


FIG-18

FIG-19

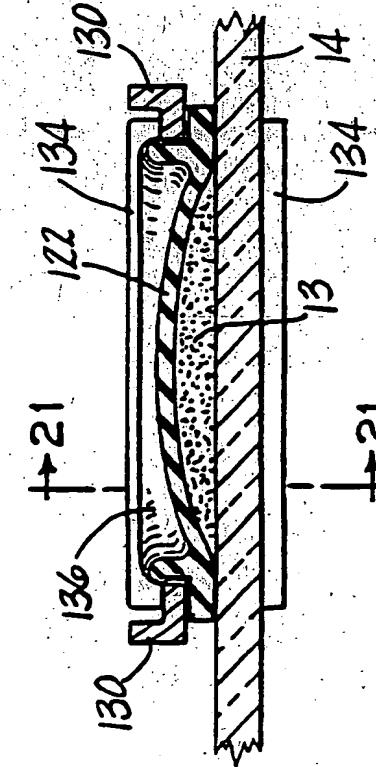
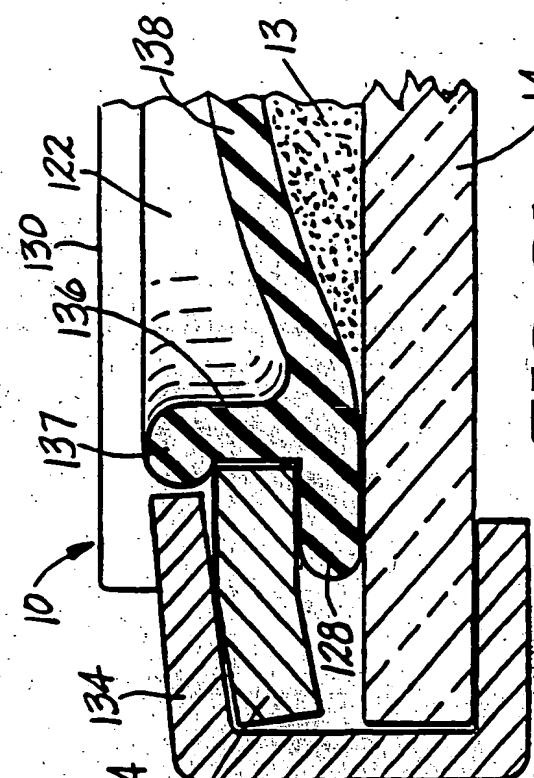


FIG-20

FIG-21

8/8 08-02-99

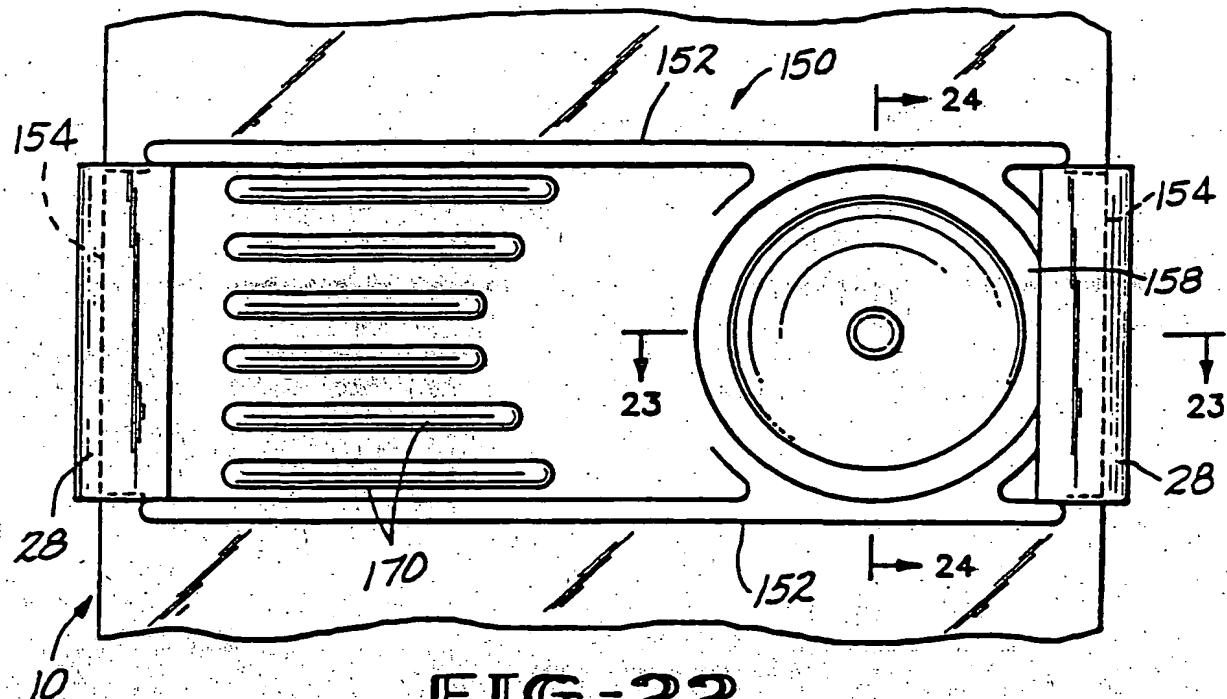


FIG-22

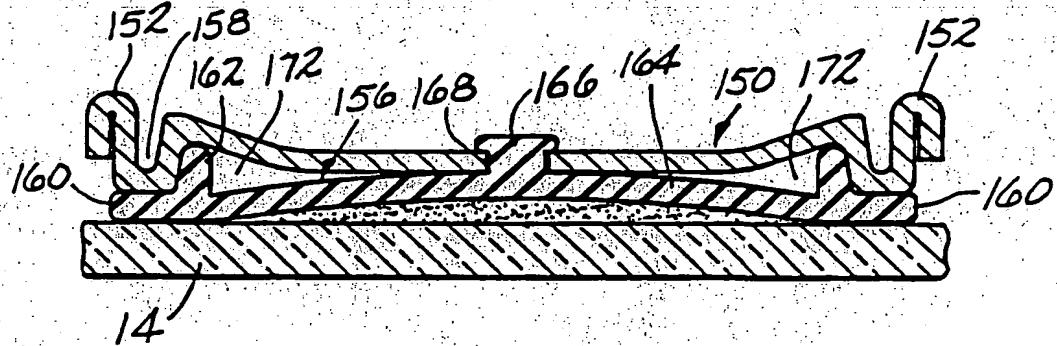


FIG-24

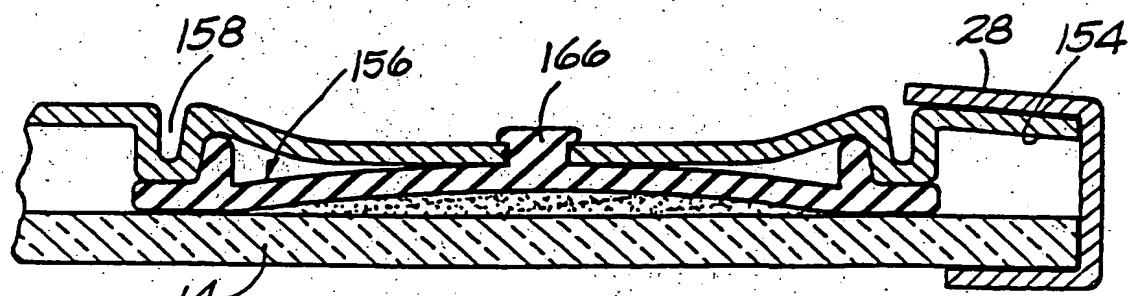


FIG-23

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.